STEROIDE UND TRITERPENE IN ZELLKULTUREN

UNTERSUCHUNGEN MIT ZELLKULTUREN VON
SOLANUM LACINIATUM AIT.,
SOLANUM WRIGHTII BTH. UND
COSTUS SPECIOSUS (KOEN) SM.

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der
FAKULTÄT FÜR CHEMIE UND PHARMAZIE
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
GUNAWAN INDRAYANTO
aus Kediri

1983

STEROIDE UND TRITERPENE IN ZELLKULTUREN

UNTERSUCHUNGEN MIT ZELLKULTUREN VON
SOLANUM LACINIATUM AIT.,
SOLANUM WRIGHTII BTH. UND
COSTUS SPECIOSUS (KOEN) SM.

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der
FAKULTÄT FÜR CHEMIE UND PHARMAZIE
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
GUNAWAN INDRAYANTO
aus Kediri

1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543903_0047

STEROIDE UND TRITERPENE IN ZELLKULTUREN

UNTERSUCHUNGEN MIT ZELLKULTUREN VON SOLANUM LACINIATUM AIT., SOLANUM WRIGHTII BTH. UND COSTUS SPECIOSUS (KOEN) SM.

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der
FAKULTÄT FÜR CHEMIE UND PHARMAZIE
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
GUNAWAN INDRAYANTO
aus Kediri

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung : 15. Februar 1983
Dekan : Prof. Dr. J. Strähle
1. Berichterstatter : Prof. Dr. E. Reinhard
2. Berichterstatter : Prof. Dr. W. Voelter

Die vorliegende Arbeit wurde im Oktober 1980 unter Leitung von Herrn Prof. Dr. E. Reinhard und Herrn Prof. Dr. W. Voelter am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen begonnen und im Oktober 1982 abgeschlossen.

Für die wertvollen Anregungen und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit danke ich
Herrn Prof. Dr. E. Reinhard und
Herrn Prof. Dr. W. Voelter
sehr herzlich.

Herzlichen Dank möchte ich aussprechen für die gute Zusammenarbeit und die wertvolle Unterstützung allen Angehörigen des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie, inbesondere den Herren Dr. W. A. Alfermann und Dr. S. Rothenberger für die zahlreichen Diskussionen.
Für die Aufnahme der CD-, GC-MS-, MS-, ^{1}H-NMR-, ^{13}C-NMR-Spektren gilt mein besonderer Dank den Mitarbeitern der CD-, MS-, NMR-Abteilung des Instituts für organische Chemie der Universität Tübingen.
Herrn Prof. Dr. V. U. Ahmad von der Universität Karachi danke ich herzlich für die Literatur von Betulinaldehyd.

Meinen Eltern in Dankbarkeit
In Liebe für Arlina
und Aloysius.

Im text werden folgende Abkürzungen verwendet:

Ac.	:Acetat
Cn⟶Co	: Cn bis Co
2,4-D	:2,4-Dichlorophenoxyessigsäure
DC	:Dünnschichtchromatographie
GA_3	:Gibberellinsäure
GC	:Gaschromatographie
GC-MS	:Gaschromatographie - Massenspektrometrie
Gluc	:Glucose
HMDS	:Hexamethyldizilazan
IBA	:Indolylbuttersäure
IAA	:Indolylessigsäure
M	:Molekülion
Me	:Methyl
MS	:Muraschige und Skoog
NAA	:Napthylessigsäure
PCV	:Sinkvolumen
rel.Int.	:Relativen Intensitäten
Rt	:Retentionszeit
RRt	:Relative Retentionszeit
S	:Stengeln
Sacch	:Saccharose
SK	:Seitenkette
TG	:Trockengewicht
TMS	:Trimethylsilyl
TMSC	:Trimethylchlorosilan
u	:Und
W	:Wurzeln

Inhaltverzeichnis:

1.Einleitung

1.1.Problemstellung 1

1.2.Der Biosyntheseweg von Steroiden in Pflanzen 2

1.3.Inhaltstoffe der intaken Pflanzen 5

2.Material und Methoden

2.1.Zellkulturen 6

2.2.Kulturmedien 6

2.3.Kalluskulturen 8

2.4.Suspensionskulturen 9

2.5.Gewinnung der Proben 10

2.6.Gewebeextraktion 10

2.7.Dünnschichtchromatographie 12

2.8.Gaschromatographie 18

2.9.Isolierung und Strukturaufklärung von X-1, F-1 , F-2 und F-4 24

2.10.Strukturaufklärung von F-3 62

2.11.Isolierung und Strukturaufklärung von Fs 80

2.12.Isolierung von Diosgenin 83

2.13.Isolierung von X-2 87

2.14.Quantitative Bestimmung der Steroidgehalt in Zellkulturen 91

2.15.Fermenterkulturen 94

3.Zusammenfassung 99

4.Literaturverzeichnis 104

1.Einleitung.

1.1.Problemstellung.

In Zellkulturen von Solanum laciniatum (Vagujfalvi et al., 1971 ; Carle,1979 ;Supniewska u.Dhonnal ,1972) und Solanum khasianum (Carle ,1979) konnte kein Steroidalkaloid (Solasodin) nachgewiesen werden.
Auch Heble et al. (1971)[b] konnten kein Solasodin (Medium MS + IAA /IBA) bzw. nur Spuren (Medium MS +2,4-D /GA_3) in Zellkulturen von Solanum xanthocarpum nachweisen.
Dagegen berichten Khanna et al.(1976) von Solasodinvorkommen in Zellkulturen von Solanum xanthocarpum ,Solanum aviculare, Solanum khasianum,Solanum ealegnifolium und Solanum nigrum.
Jain,M.et al. und Jain ,Samoo (1981) berichten über die Isolierung von Solasodin in Zellkulturen aus Solanum jasmoides und Solanum verbascifolium.
Die Vorstufe von Steroidalkaloiden ,Steroidsapogeninen,Phytosterinen und Triterpenen ist Squalen.An Hand von Markierungsversuchen konnte eindeutig gezeigt werden,daß Cholesterin durch Pflanzen zu Steroidalkaloiden und Steroidsapogeninen umgesetzt wird (Willuhn,1976 ;Heftmann,1970 ;Overton und Picken,1977 ; Roddick ,1980).
Das Ziel der vorliegenden Arbeit war,herauszufinden, bis zu welcher Stufe die Steroide in Zellkulturen von Solanum laciniatum, Solanum wrightii und Costus speciosus synthetisiert werden.
Außerdem sollte nachgeprüft werden,welchen Einfluß Veränderungen der Mediumzusammensetzung (Wuchstoffe ,Casein u.a.) auf die Steroidproduktion haben.

1.2. Der Biosyntheseweg von Steroiden in Pflanzen.

Die einheitliche Vorstufe des Steroidringsystems in allen Organismen ist der aliphatische Kohlenwaserstoff Squalen. Nach seiner Oxydation zum 2,3- Expoxid cyclisiert sich Squalen zu verschiedenen tetracyclischen und pentacyclischen Ringsystem (siehe Abb.1.1.).

In Abb.1.2. ist ein möglicher Steroid - Biosyntheseweg in Pflanzen angegeben (Willuhn ,1976 ; Grunwald ,1980 ; Clayton , 1965).

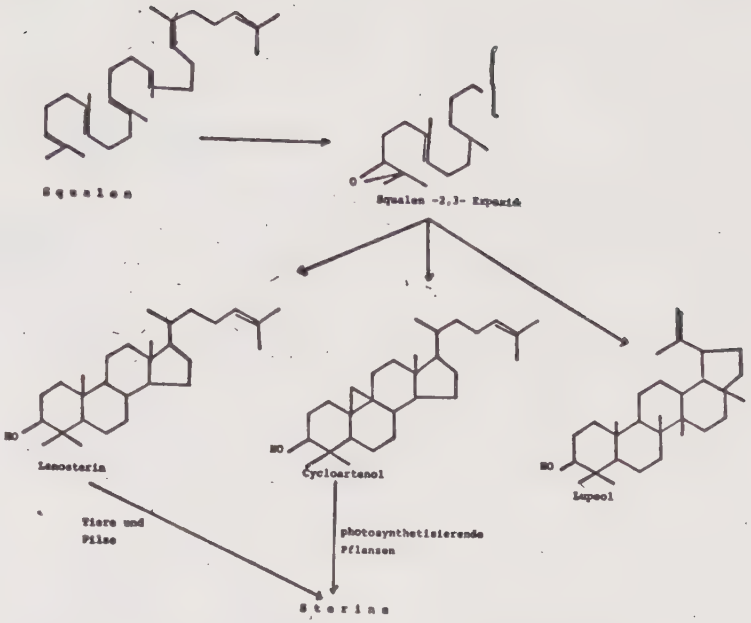


Abb.1.1 Cyclisierung von Squalen.

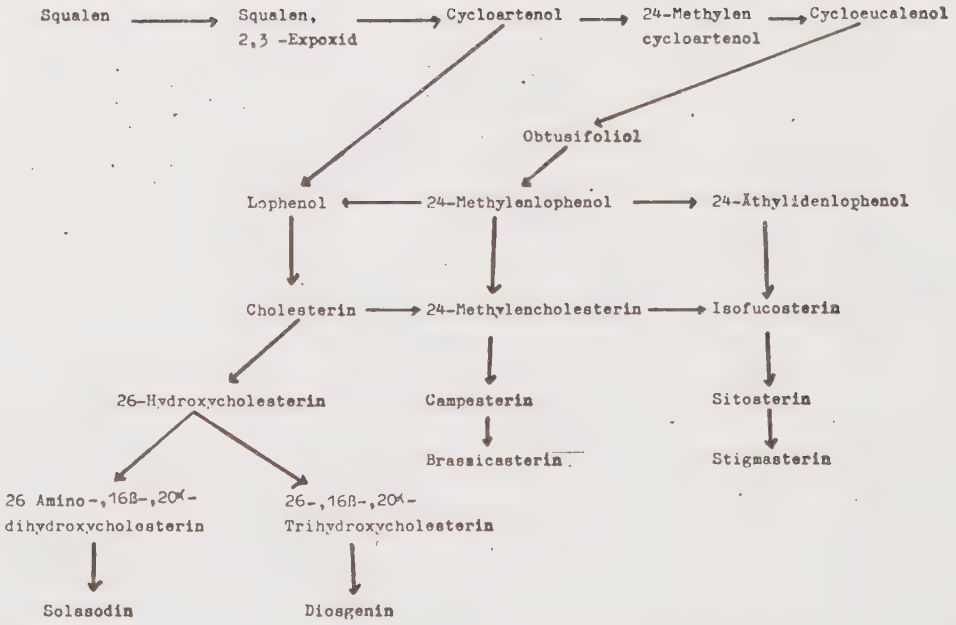


Abb.1.2. Biosyntheseweg von Steroiden in Pflanzen.

2.Material und Methoden.

2.1.Zellkulturen.

2.1.1.Solanum laciniatum Ait.

Die Zellkulturen stammen von Stengeln ab.Die Kalluskulturen wurden im Oktober 1980 angelegt.Sie waren hellbraun bis hellgrün.

2.1.2. Solanum wrightii Bth.

Die Zellkulturen stammen von Stengeln ab. Die Kalluskulturen wurden im Oktober 1980 angelegt.Sie waren hellbraun bis grün.

2.1.3.Costus speciosus(Koen) Sm.

Die Zellkulturen wurden aus Stengeln und Wurzeln gewonnen.
Kalluskulturen angelegt im Oktober 1977.
Sie waren farblos bis gelb.

2.2. Kulturmedien.

Als Nährlösung wurde das modifizierte Medium nach Murashige und Skoog (1962) verwendet.
Das Grundmedium setzt sich wie folgt zusammen(Angaben in mg/l):

NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$CaCl_2 . 2 H_2O$	440
$MgSO_4 . 7 H_2O$	370
KH_2PO_4	170

Tabelle 2.1.weitere Zusätze zum Grundmedium zur Herstellung der G -Medien .

Medium	NAA(mg/l)	IAA(mg/l)	2,4-D(mg/l)	Kinetin (mg/l)	Casein (g/l)	Sacch. (g/l)
G-48	-	0,20	0,10	2,0	-	20
G-75N	0,50	-	-	2,0	-	30
G-75NC	0,50	-	-	2,0	1,0	30
G-75I	-	0,50	-	2,0	-	30
G-75IC	-	0,50	-	2,0	1,0	30
G-75D	-	-	0,50	2,0	-	30
G-75DC	-	-	0,50	2,0	1,0	30
G-75NoS	0,50	-	-	2,0	-	-

Fe-EDTA	42,80
H_3BO_3	6,20
$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	18,40
$ZnSO_4$	6,00
KJ	0,83
$NaMO_4 \cdot 2H_2O$	0,25
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,025
meso-Inosit	100,00
Glycin	2,00
Nikotinsäure	0,50
Pyridoxin HCl	0,50
Thiamin HCl	0,10

Dieses Grundmedium wurde entsprechend der Tabelle 2.1. durch Wuchstoffe und Komplexzusätze komplettiert.
Der pH-Wert wurde vor der Bearbeitung mit dem Autoclaven auf 5,50 (G-48) bzw. 5,70 (G-75) eingestellt.
Für die Kalluskulturen wurden 10 g /l Agar zugesetzt.

2.3. Kalluskulturen.

2.3.1.Anlegen von Kalluskulturen.

Nach den bei Koblitz (1972) zusammengestellten allgemeinen Methoden der Kulturtechnik wurden Kalluskulturen auf einem Agar-Medium angelegt.Von den entsprechenden Topfpflanzen wurden Sproßabschnitte mit ca. 5mm Durchmesser abgeschnitten und deren Blätter enfernt.Die Stengelstücke wurden ca. zwei Minuten lang in Ethanol (96 %) eingelegt und anschließend 10 Minuten lang in 10 % Dimanin-C-Lösung* (Fa.Bayer) an der Obenflächen bis zur beginnenden Weißfärbung der Randzonen sterilisiert.Danach wurde dreimal mit sterilem H_2O abgespült.2mm dicke Scheiben des Pflanzenmaterials wurden in kleinen Petrischalen ausgelegt,deren Füllmenge je 15 ml Nähragar betrug.
Für Solanum laciniatum und Solanum wrightii wurden das Medium G-75 N, für Costus speciosus das Medium G-48 verwendet.

---

* :Wirkstoff :Organiscne Chlorverbindung

Nach 7 - 14 Tagen bildete sich an den Schnittflächen der Stengelstücke farbloses bis grünes Gewebe.
Die entstandenen Calli wurden nach 3 - 4 Wochen Kulturdauer in 300 ml Erlenmeyerkolben mit je 100 ml Nähragar überführt.

2.3.2.Kulturbedingungen.

Die Kultivierung der Zellkalluskulturen erfolgte in Kulturschränken bei einer Temperatur von 25 $\pm$1°C und einer Beleuchtung von ca. 2000 Lux Dauerlicht (Osram -L-Floura 40 w /77).

2.3.3.Erhaltung der Kalluskulturen.

5 g Gewebe (bezogen auf das Frischgewicht)wurde in 300 ml-Erlenmeyerkolben mit je 100 ml Nähragar kultiviert ;nach 30 Tagen wurde die Kultur in ein neues Medium gebracht.

2.4.Suspensionskulturen.

2.4.1.Anlegen von Suspensionskulturen.

1 g Kallus wurde in 25 ml Nährlösung pro Kolben (100 ml Erlenmeyer) eingewogen und auf Rundschüttelmaschinen weiterkultiviert. Nach 5 -6 Passagen von jeweils 10 -14 Tagen konnte ausreichend feines Gewebe bei gutem Waschtum erzielt werden.

2.4.2.Kulturbedingungen.

Die Kultivierung der Suspensionskulturen erfolgte in Inkubationsmaschinen (Typ ,RC-1, Fa.Infors AG, Basel,Shweiz) mit 100-130 Upm bei einer Temperatur von 25$\pm$1°C. Für Solanum laciniatum und Costus speciousus wurde eine Beleuchtung von 2000 Lux Dauerlicht (Osram -L-Floura 40 w/77) und für Solanum wrightii Shwachlicht (Osram-L-15 w/25-2) verwendet.

2.4.3.Erhaltung der Suspensionskulturen.

30 g Gewebe(bezogen auf das Frischgewicht)wurden in 300 ml Nährlösung (1 l -Erlenmeyerkolben) kultiviert.
Die Dauer einer Kulturpassage betrug 1 Woche (Solanum laciniatum und Solanum wrightii) bzw. 2 Wochen (Costus speciosus).

2.5.Gewinnung der Proben.

2.5.1.Kalluskulturen.

Das Gewebe wurde eingefroren und anschließen in der Gefriertrocknungsanlage (Typ. Delta 1, Der Firma Christ ,Osterrode, Herz) lyophylisiert.
Das lyophylisierte Gewebe wurde gewogen und pulverisiert.

2.5.2.Suspensionskulturen.

Die Proben wurden durch Filtration in Gewebefraktion und Kulturfiltrat getrennt.
Die Gewebefraktion wurde 3mal mit bidestilliertem H_2O gewaschen und wie 2.5.1.beschriebenen,weiter verarbeitet.

2.6. Gewebe-Extraktion.

Zur Untersuchung auf Steroide wurde das pulverisierte Gewebe nach modifizierten Methoden von Kösten,Willuhn (1973), Helmbold (1977) ,Carle , Reinhard (1979) , Heble ,Staba (1980 a,b) extrahiert.

Abb. 2.1. stellt den Extraktionsprozeß dar.

2.6.1. Gewinnung des Petrolether-Extrakts.

Zur Aufklärung der Inhaltstoffe wurden 30-50 g pulverisierte Gewebe mit 750 ml Petrolether (30-50) 3mal 2 Stunden bei 60-65°C am Rückfluß extrahiert.Das Filtrat wurde am Rotationverdampfer zur Trockne eingeengt.

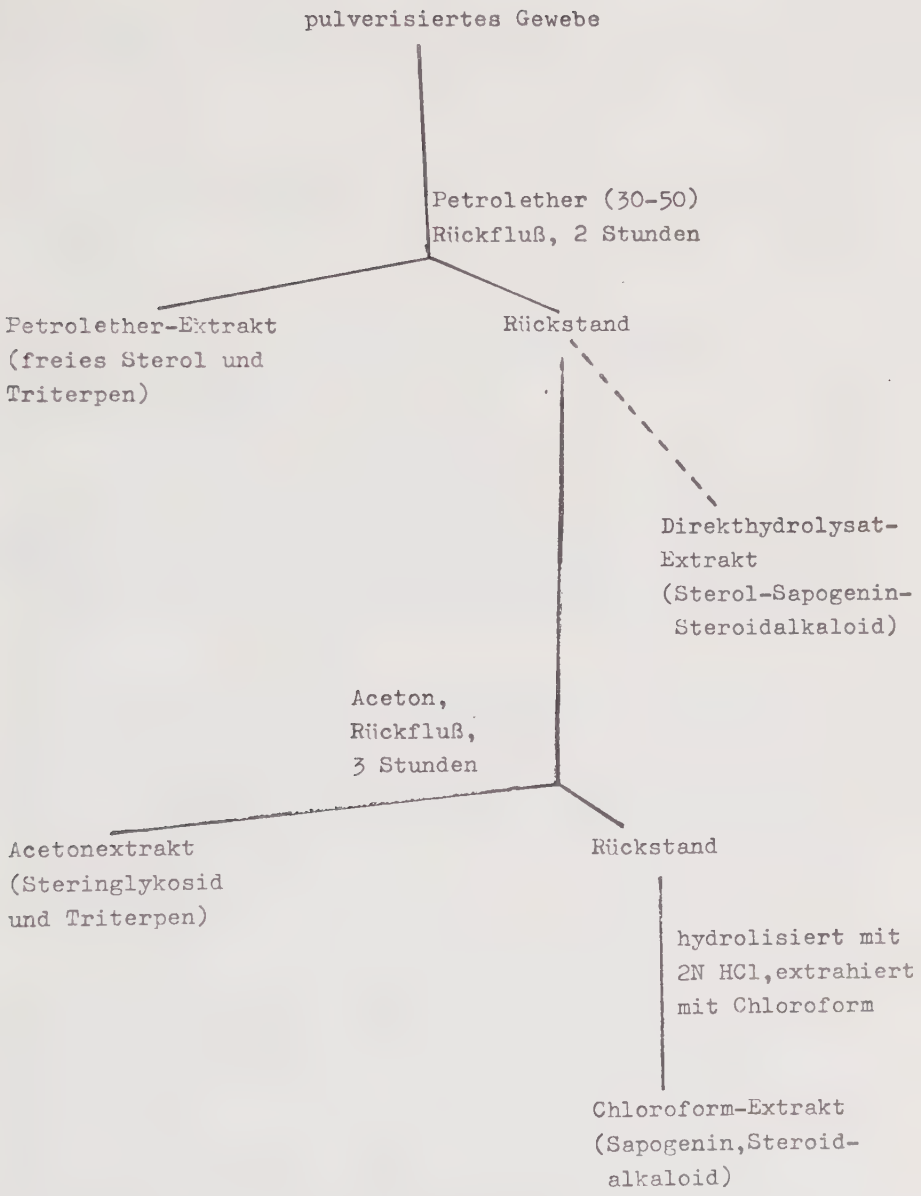


Abb.2.1.Schematische Darstellung des Extraktionsprozesses .

Für die quantitative Untersuchung wurden 1-2 g Probe mit 100 ml Petrolether in gleicher Weise behandelt.

2.6.2.Gewinnung des Aceton-Extrakts.

Der Rückstand von 2.6.1. wurde mit 500 ml Aceton 2mal bei 80-85°C am Rückfluß extrahiert.Die Filtrat wurde zur Trockne eingenngt.

2.6.3. Gewinnung des Chloroform-Extrakts.

Der Rückstand von 2.6.2. wurde mit 500 ml 2N HCl 2 Stunden bei 100°C am Rückfluß gekocht.Nacdem der Extrakt abgekühlt war,wurde er über ein Seitz-Filter filtriert.
Der Rückstand wurde mit Wasser bis zur neutralen Reaktion gewaschen,anschließend mit 1N NaOH alkalisch gemacht und wieder mit Wasser neutral gewaschen.Der Rückstand wurde über Nacht bei 50°C im Trockenschrank getrocknet.Das trockene Seitz-Filter wurde mit Chloroform bei 80°C am Rückfluß extrahiert.

2.6.4.Gewinnung des Direkthydrolysat-Extrakts.

Für die Vorprüfung auf Diosgenin,Tigogenin und Solasodin wurde der Rückstand von 2.6.1. direkt mit 2N HCl 2 Stunden bei 100°C hydrolisiert.

Das Hydrolysat wurde wie unter angegeben 2.6.3.weiterverarbeitet.

2.7.Dünnschichtchromatographie (D C.)

Zur orienterenden Untersuchung wurde der Proben-Extrakt auf 20 x20 cm Kieselgel 60 F254 Fertigplatten (Schichtdicke 0,25 mm, Fa.Merck) zusammen mit den Referensubstanzen chromatographiert.

2.7.1. DC. des Petrolether-Extrakts.

Zur Untersuchung des Extrakts wurden folgende Fließmittel verwendet:
Hexan /Essigsäureethylester (8/2) (1),

Chloroform / Essigsäureethylester (9 /1) (2).

Detektion :
1. H_2SO_4 50 % (nach Hunter et al.,1976)
2. Anisaldehyd 0,5 ml
Essigsäure 15,0 ml
H_2SO_4 5,0 ml
Methanol 85,0 ml (nach EAB,Kommentar,1976)

Nach dem Besprühen wurden die DC-Platten im Trockenshrank 5-10 Minuten bei 100 - 105°C erhitzt und im sichtbaren und UV-(366nm) Licht ausgewertet.

Das DC des Extrakts in Abb.2.2.zeigt 5 gut getrennte Flecken (Fs,F-1,F-2,F-3 und F-4).
Cholesterin (Fa.Sigma) ,Stigmasterin (Fa.Serva), Sitosterin (Fa.Roth), Sitosteringemisch (Fa.California Co.for Biochemical Research ,ein Gemisch von Sitosterin,Stigmasterin u.Campesterin), und F-3 hatten den gleichen Rf-Wert und färbten sich dunkel - violett.
Substanz Fs und Squalen(Fa.Sigma)hatten den gleichen Rf-Wert und färbten sich violett wie auch die Flecken F-1,F-2 und F-4.
Das DC vom Extrakt zeigte, daß sich im allen Extrakten die 4 Steroide und Squalen befinden können (F-3 u.Fs).
F-1 ,F-2 und F-4 sind nur im Extrakt von Solanum laciniatum und Solanum wrightii vorhanden.

2.7.2.D C. desAceton-Extrakts.

Als Fließmittel wurde verwendet :
Chloroform / Methanol (90 /15) (3)
Detektion: wie 2.7.1.

Die DC-Untersuchung (siehe Abb.2.3.) des Extrakts ergab 7 gut getrennte Flecke (X_o,X_1,X_2,Y_1,Y_2,Y_3 und Y_4) , von denen sich nur drei,X_o,X_1 und X_2, violett bis dunkelviolett färbten.
X_2 hat mit 0,53 den gleichen Rf-Wert wie das von Kösten u.Willuhn

1. Cholesterin
2. Solanum laciniatum
3. Solanum wrightii
4. Costus speciosus (S /W)
5. Stigmasterin
6. Squalen
7. Sitosterin
8. Sitosteringemisch
(Campesterin ,Stigma-
sterin und Sitosterin)

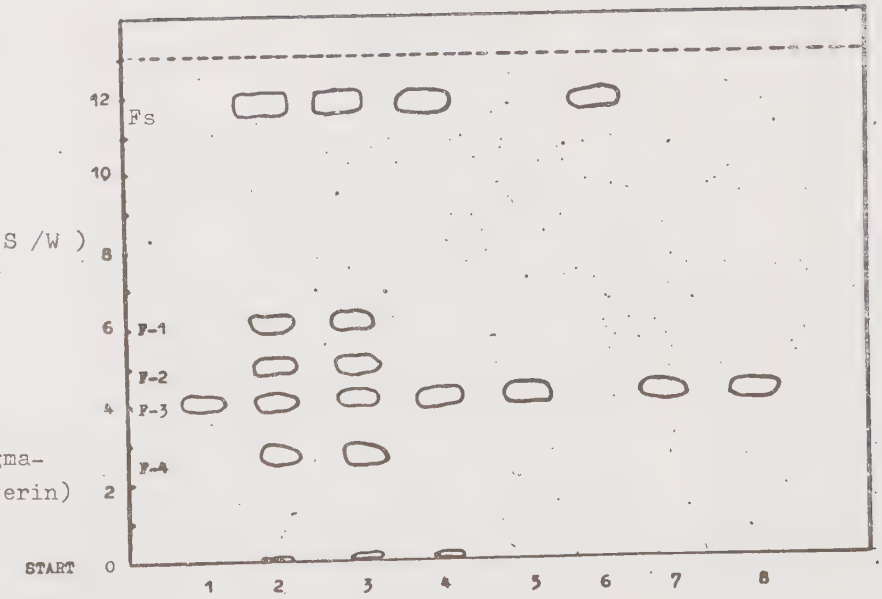


Abb.2.2. DC des Petrolether-Extrakts.

(1973) gefundene Steringlykosid.Y_1 und Y_4 fluoresierten im langwelligen UV -Licht.
Y_1,Y_2,Y_3 und Y_4 zeigten mit keinem der verwendeten Sprühreagenzien die für Steroide und Triterpen spezifische Farbreaktion und wurden daher nicht weiter untersucht.

2.7.3. DC | des Hydrolysat-Extrakts.

Als Fließmittel wurden verwendet :

Chloroform / Essigsäureethylester (9 /1) (2),
Chloroform / Methanol (9/1) (4).

Detektion :wie 2.7.1. (Anisaldehyd).

Mit Fließmittel (2) geben Diosgenin und Tigogenin den gleichen Rf-Wert (0,42) ;Solasodin bleibt am Start zurück.
Bei Verwendung von Fließmittel (4) beträgt der Rf-Wert für Diosgenin u.Tigogenin 0,64 ,für Solasodin 0,20.
Die DC-Untersuchungen des Extrakts zeigten,daß in keinem Fall ein Fleck auftrat mit gleichem Rf-Wert wie Solasodin.Der Extrakt Solanum laciniatum ergab einen Fleck (B) mit gleichem Rf-Wert wie Diosgenin (Fa.Roth) und Tigogenin (Fa.Roth).Die beiden Flecke färbten sich gelb.
Fleck A,der den gleichen Rf-Wert wie das Sitosteringemisch aufwies,wurde im allen Extrakten (Solanum laciniatum,Solanum wrightii u.Costus speciosus) nachgewiesen.Beide Flecken färbten sich dunkel violett.Fleck A fehlte,wenn der Chloroformextrakt auf die DC-Platten aufgetragen wurde.Diese DC-Ergebnisse,wie auch die in 2.7.2. geschilderten Befunde deuten auf eine Anwesenheit des Sterin-Glykosids in allen Extrakten hin.
Es ist nicht möglich,Diosgenin und Tigogenin mit normalen Kieselgel-Platten zu trennen.Um Diosgenin und Tigogenin zu unterschieden, wurde eine modifizierte Methode nach Dawidar et al. (1973) verwendet ,welche unter folgende experimentellen Bedingungen arbeitet :
Stat.Phase :mit 2 % $AgNO_3$ imprägnierte Kieselgel 60 F254 - Fertigplatten (schichtdicke 0,25 mm,Fa.Merck),

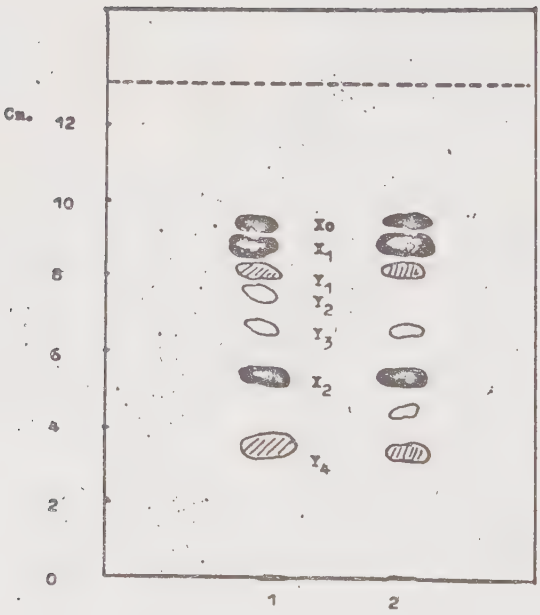


Abb.2,3. DC des Aceton-Extrakts.

1.Solanum laciniatum,

2.Solanum wrightii.

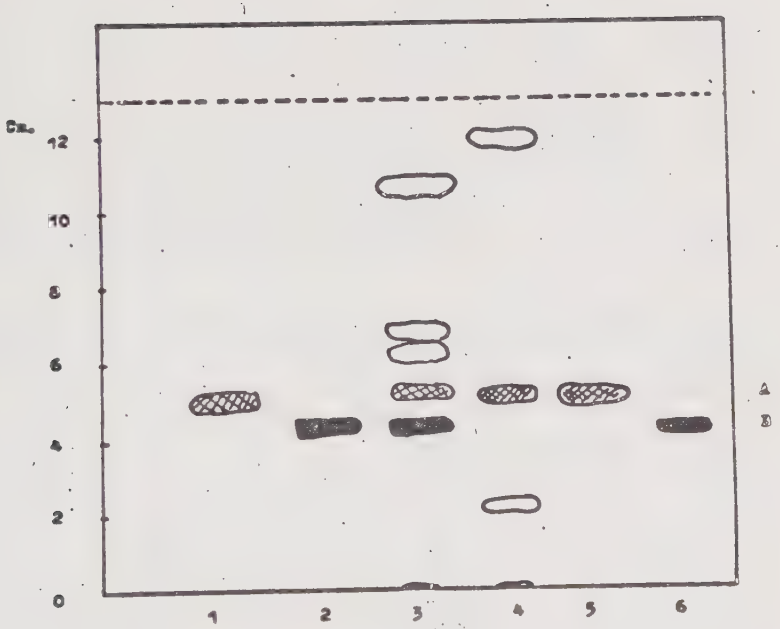


Abb.2.5.DC des Direkthydrolysat-Extrakts,

1,5 .Sitosteringemisch,
2. Diosgenin,
3. Solanum laciniatum,
4. Costus speciosus (S / W),
6. Tigogenin.

Fließmittel :Dichlormethan /Aceton (98 /2) (5),
dreifach Entwicklung.

Diese modifizierte DC-Methode ermöglicht eine Trennung von Diosgenin (Rf= 0,78) und Tigogenin (Rf =0,60).Mit ihrer Hilfe konnte gezeigt werden ,daß der Extrakt von Solanum laciniatum kein Tigogenin, wahrscheinlich aber Diosgenin enthält.

2.8.Gaschromatographie.

Knights(1967 ;1973),Helmbold (1977) und Heftmann (1973) haben die gaschromatographische Trennung der 4 -Desmethylsterole beschrieben.
Durch die Koppelung eines Gaschromatographen mit einem Massenspektrometer lassen sich die Subtanzen außerdem direkt identifizieren.Daher wurde diese Methode einer dünnschichtchromatographischen Trennung mit imprägnierten Platten (Schmitt und Benveniste ,1979 ; Waller 1981) vorgezogen.

Die Gaschromatogramme wurden mit einem Hewlett-Packard-Gerät vom Typ 5700A und einem "Reporting Integrator " vom Typ 3390a (Hewlett-Packard) aufgenommen.
Zur Gaschromatographie wurden für Methode I folgende experimentellen Bedingungen verwendet :

Säule	: Glas, 2m x 2mm,
Stationäre Phase	: OV-; 3 % auf Gaschrom Q 100 -120 mesh, (Fa. Applied Science),
Trägergas	: Helium 30 ml /min,
FID-Temperatur	: 300°C,
Injektortemperatur	: 300°C,
Temperaturprogramm	: 200 -280 °C , 4°/min.

Bei den folgenden Gaschromatogrammen (Abb.2.5.,2.6.,2.7.,2.8.) wurden die Rohpetroletherextrakte der Kalluskulturen und auch die Referensubstanzen eingespritzt . Die Gaschromatogramme zeigten daß die Rt (Retentionszeit) der Peaks s,1,2,3 und 4 mit Squalen, Cholesterin ,Campesterin ,Stigmasterin , und Sitosterin identisch ist. In Tabelle 2.2. wurden die RRt (Relative-Retentionszeiten) von Stigmasterin und die GC-Profile angegeben.

Abb.2.5. Gaschromatogramm eines Petroletherextrakts aus Solanum laciniatum (Kalluskulturen).

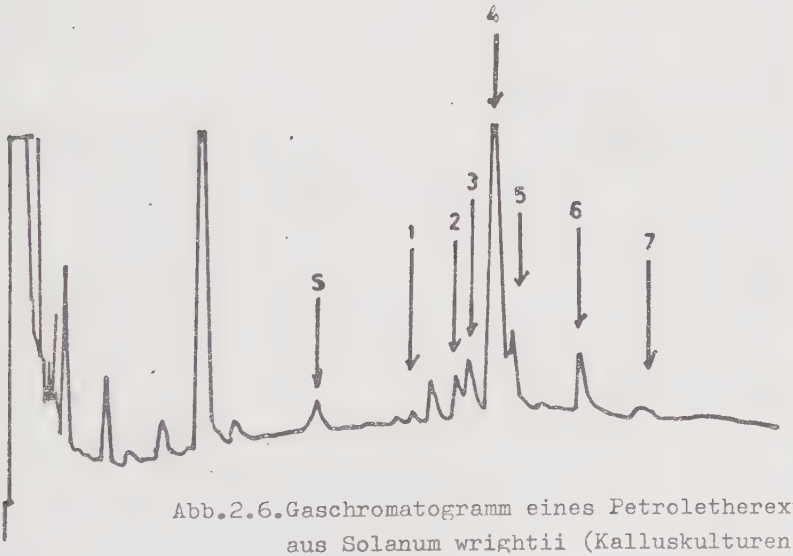


Abb.2.6.Gaschromatogramm eines Petroletherextrakts aus Solanum wrightii (Kalluskulturen).

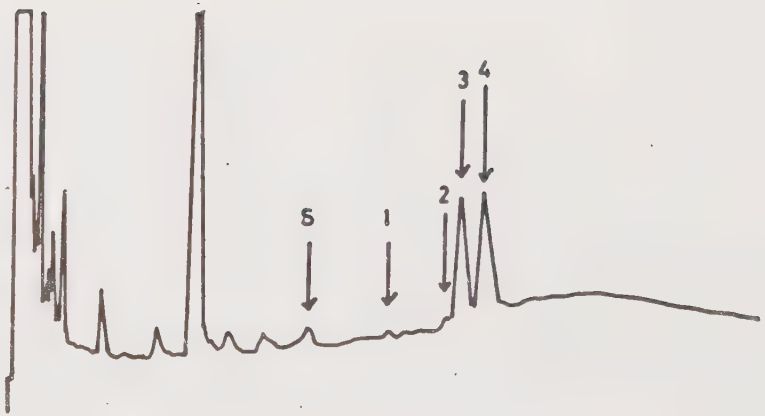


Abb.2.7. Gaschromatogramm eines Petrolether-extrakts aus Costus speciosus (S).

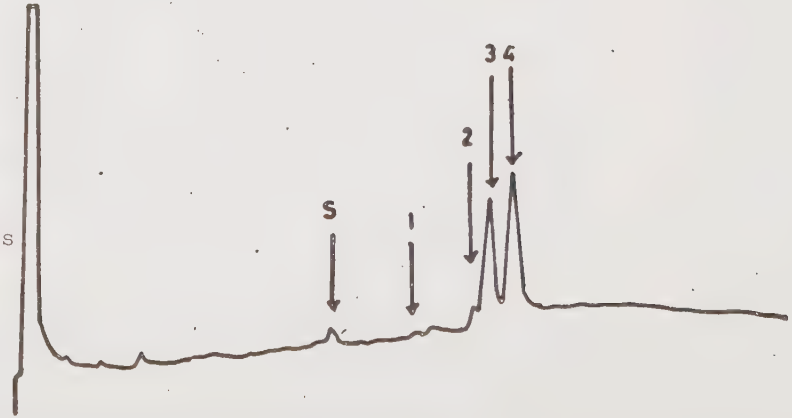


Abb.2.8. Gaschromatogramm eines Petrolether-extrakts aus Costus speciosus (W).

Tabelle 2.2. GC-Profile der Petrolether-Extrakte.

Zellkulturen (Medium)	Typ	Peaks(RRt) s (0,66)	1 (0,88)	2 (0,97)	3 (1,00)	4 (1,05)	5 (1,12)	6 (1,25)	7 (1,43)
SL (G-75N)	K	+	+	+	+	+	+	+	+
SW (G-75N)	K	+	+	+	+	+	+	+	+
CS (G-48)	K	+	+	+	+	+	-	-	-
CW (G-48)	K	+	+	+	+	+	-	-	-
SL (G-75N)	S	+	+	+	+	+	+	+	+
SL (G-75NC)	S	+	+	+	+	+	+	+	+
SL (G-75I)	S	+	+	+	+	+	+	+	+
SL (G-75IC)	S	+	+	+	+	+	+	+	+
SL (G-75IC)	S	+	+	+	+	+	+	+	+
SL (G-75D)	S	+	+	+	+	+	-	-	-
SL (G-75DC)	S	+	+	+	+	+	-	-	-
SL-D(G-75N)	S	+	+	+	+	+	+	+	-
SW (G-75N)	S	+	+	+	+	+	+	+	+
CS (G-48)	S	+	+	+	+	+	-	-	-
CW (G-48)	S	+	+	+	+	+	-	-	-

Rt Stigmasterin=16,20 Minuten.

Typ :K=Kalluskulturen ;S=Suspensionskulturen.

SL=Solanum laciniatum;SL-D=Zellkulturen von SL,die im Dunkel kultiviert;SW=Solanum wrightii;CS=Costus speciosus stammt Stengel ;CW =Costus speciosus stammt Wurzel.

Das Ergebnis der GC zeigt, daß die Zellkulturen von Solanum laciniatum und Solanum wrightii das gleiche Inhaltstoffmuster haben, wie auch die beiden Stämme von Costus speciosus diesbezüglich untereinander gleich sind.

Um die Steroigehalt aus dem Rohpetrolether-Extrakt anzureichen, wurde dieser auf präparative DC-Platten aufgetragen.

Stationäre-Phase	:Kieselgel 60 F254,PSC-Fertigplatten (Schichtdicke 1mm,Fa.Merck),
Fließmittel	:Fließmittel (2),zweifach Entwicklung,
Detektion	:Berberin HCl 0,1% in Ethanol (nach Schmitt u.Benveniste,1979).

Die Fraktionen Fs,F-1,F-2,F-3 und F-4 wurden einzeln ausgekratzt und mit Chloroform zweimal am Rückfluß zwei Stunden extrahiert. Fraktionen Fs,F-1,F-2,F-3 und F-4 wurden einzeln in den GC eingespritzt.Die Ergibnisse wurden in folgende Tabelle 2.3. angegeben.

Tabelle 2.3.

Fraktion (präp.-DC)	Peaks (GC)
Fs	s
F-1	5
F-2	6
F-3	1,2,3 u.4
F-4	7

Die Fraktion F-3,die im DC nur einen Fleck ergab, wurde im GC in 4 Peaks getrennt (Peaks 1,2,3 u.4).
Abb. 2.9. zeigt das Gaschromatogramm der Fraktion F-3 der Solanum wrightii-Kalluskulturen . Außer Peaks 1,2,3 und 4 die gut getrennt werden konnten, trat als Verunreinigung Peak 6 auf.

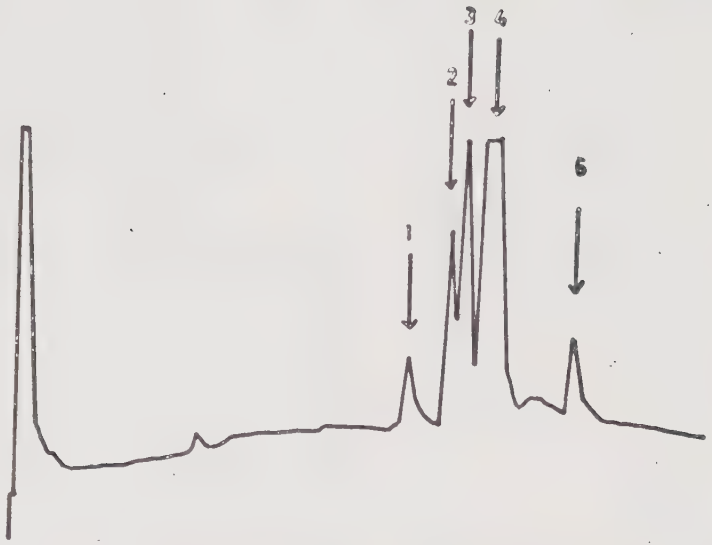


Abb.2.9. Gaschromatogramm einer Fraktion F-3 aus Solanum wrightii (Kalluskulturen).

Die GC-Untersuchung deutet darauf hin ,daß in allen Petrolethenextrakte Squalen,Cholesterin,Campesterin,Stigmasterin und Sitosterin enthalten sind.Außerdem erscheinen aber auch 3 unbekannte Peaks (5 - 7) in Zellkulturen von Solanum laciniatum und Solanum wrightii.

2.9.Isolierung und Strukturaufklärung von X-1,F-1,F-2 und F-4.

2.9.1.Isolierung von F-1,F-2 und F-4.

Der Petrolether-Extrakt der Kalluskulturen (2.6.1.) wurde auf eine Kieselgelsäule gegeben (30 x2,5 cm;55 g Kieselgel;Körngröße 0,1-0,2 mm,Fa.Macherey Nagel Co.),und mit Hexan /Essigsäureethylester (8/2) eluiert.Das Elutionsmittel wurde mit einer Dosierpumpe (Duramat,Firma Cfg.,Heidelberg) gefördet.Das Eluat wurde in Fraktionen von je 7,5 ml aufgefangen.Die Fraktionen wurden mit einem Fraktionssammler Ultraroc 7000 (Fa.LKB) gesammelt.
Von jeder Fraktion wurde ein DC eingefertigt (DC-Bedingungen wie 2.7.1.).

Die Fraktionen	5-15	enthielten	Fs,
	16-20		-
	21-28		F-1,
	29-32		F-1 und F-2 ,
	33-35		F-2,
	36-42		F-2 und F-3,
	43-50		F-3,
	51-58		F-3 und F-4,
	58-75		F-4 .

Die zusammengehörenden Fraktionen wurden zur Trockne eingeengt und durch präparative DC nochmals gereinigt,und zwar unter folgenden Bedingungen :

Stationäre Phase :Kieselgel 60 F254,PSC-Fertigplatten (Schichtdicke 1mm, Fa.Merck),

Fließmittel :Fließmittel (1)zweifach Entwicklung,

Detektion :Berberin HCl 0,1 % in Ethanol.

Die DC-Banden wurden einzeln ausgekratzt,mit Chloroform am Rückfluß 2 Stunden 2mal extrahiert,und mit Methanol umkristalisiert.

2.9.2.Isolierung von X-1.

Der Aceton-Extrakt der Kalluskulturen (2.6.2.) wurde auf eine Kieselgelsäule gegeben (30 x 2,5 cm;55g Kieselgel,Körngröße 0,1-0,2 mm,Fa.Macherey Nagel Co.) und mit Chloroform /Methanol (90/15) eluiert und weiter verarbeitet wie unter 2.9.1.angegeben Wieder wurden die einzelnen Fraktionen dünnschichtchromatographis untersucht (siehe 2.7.2.).

Die Fraktionen 7 -15 enthielten Xo,X-1 und Y-1,
16 -25 X-2 und
26 - 55 Y-4 .

Die zusammengehöriden Fraktionen wurden zur Trockne eingeengt und auf einer präparative DC-Platten aufgetragen.

Stationäre-Phase :Kieselgel 60 F254,PSC-Fertigplatten (Schichtdicke 1mm ,Fa.Merck),
Fließmittel :Fließmittel (3),
Detektion :Berberin HCl 0,1 % in Ethanol.

Die DC-Banden wurden einzeln ausgekratzt und mit Chloroform/ Methanol (90/15) extrahiert,und zur Trockne eingeengt.Der Rückstand von X-1 wurden 4-5mal mit Methanol umkristalisiert. Die geringen Mengen von Xo reichten für eine Isolierung und weitere Untersuchung nicht aus.

Die isolierten Substanzmengen an X-1,F-1,F-2 und F-4 wurden in Tabelle 2.4. angegeben.

Tabelle 2.4. Isolierte Substanzmengen aus 50 g Gewebe-Trockenmasse.

Subtanz	S.laciniatum	S.wrightii
F-1	2 mg	1 mg
F-2	1 mg	+
F-4	34 mg	1 mg
X-1	84 mg	1 mg

+ : Spur

2.9.3.Derivatisierung.

2.9.3.1. Acetat-Derivatisierung.

0,5 -1,0 mg Subtanz wurde mit 0,25 ml Pyridin und 0,75 ml Essigsäureanhydrid bei Zimmertemperatur 12 Stunden inkubiert (nach Heintz und Benveniste,1970).
Danach wurde das Lösungsmittel zur Trockne eingeengt.Der Rückstand wurde mit Methanol umkristalisiert.

2.9.3.2.Methylester-Derivatisierung.

Darstellung von Diazomethan aus Nitrosomethylharnstoff.

In einem Erlenmeyer-Kolben wurden unter daurendem Schwenken des Gefäßes ca.0,1 M Nitrosomethylharnstoff in kleinen Portionen in 100 ml Ether eingetragen, der mit 35 ml gekühlter 40%iger KOH unterschichtet war.Die Temperatur durfte dabei 5°C nicht überschreiten.10 Minuten nach der letzten Zugabe goß man die etherische Diazomethanlösung ab und trocknete sie 3 Stunden über wenig festem KOH (nach Organikum, 1970)

Methylierung von X-1 :

1-2 mg wurden in Ether gelöst,und bei Zimmertemperatur in einem kleinen Erlenmeyer unter Schwenken mit so viel etherischer Diazomethanlösung versetzt,bis eine schwache Gelbfärbung bestehen blieb.Dann laßt man 15 Minuten bei Zimmertemperatur stehen.Das Lösungsmittel wurde im Vacuum abgezogen und der Rückstand mit Methanol umkristallisiert.

2.9.4.Spektrokopische Charakterisierung.

IR-Spektren:
Die IR-Spektren (KBr) wurden mit einem Beckman-Gerät vom Typ IR 4250 aufgenommen.

CD-Spektren:
Die CD-Spektren wurden mit einem Gerät vom Typ Dichrographe II (Fa.Roussel-Jouan Paris) aufgenommen.
Alle Proben wurden in Dioxan gelöst.

Massenspektren:
Die Spektren wurden mit einem Finnigan MAT 711A-Massenspektrometer bei folgenden Gerätparametern aufgenommen:
Ionenquelle : 200°C, Ionisierungenergie : 70 eV.

^{1}H-NMR-Spektren:
Die Messungen wurden mit einem Bruker WH-90-Spektrometer (90 MHz) und Bruker WM-400-Spektrometer (400MHz) durchgeführt. Als Lösungsmittel wurde $CDCl_3$ verwendet.Innerer Standard war TMS.

^{13}C-NMR-Spektren:
Die Spektren wurde mit einem Bruker WP-80-Spektrometer (20,11 MHz) aufgenommen.Als Lösungsmittel wurde $CDCl_3$ bzw. Pyridin-d_5 verwendet.Innerer Standard war TMS.

2.9.5.Strukturaufklärung von X-1.

Aufgrund der Massenspektren und ^{1}H-NMR-Spektren von X-1 bzw. X-1-Acetat (siehe Tabelle 2.5., 2.6.; Abb.2.11.,2.12.,2.13., 2.14.) muß es sich bei X-1 um einen Triterpenalkohol der Lupan-Reihe mit einer OH-Gruppe an C-3 und einem MG von 456 handeln (vgl. Budzikiewicz et al. 1963 ; 1964 ; Singh et al.1975 ; Shamma et al. 1962 ; Lehn, Ourrison, 1962 ;Itoh et al.,1973[a]). Die Peaks mit m/e-Werten von 189 ,207 (249) ,220 (262) sind charakteristisch für die Lupan-Reihe.
Das IR-Spektrum von X-1 (Abb.2.15.) zeigt Absorptionsbanden bei 1700 cm^{-1}($\geq C = O$) ,1650 ,890 cm^{-1} (-C = C -),3450 cm^{-1}(-OH) und 2960 ,2930 cm^{-1}(-C - H).
Die Massenspektren von X-1 und X-1 -Acetat weisen Peaks mit m/e-Werten von 411,410,248,219,453 und 452 auf.Diese Peaks zusammen mit den IR-Spektrum stellen einen ersten Hinweis, auf eine Carboxylgruppe dar.
Das Massenspektrum des mit Diazomethan nach 2.9.3.2. erhaltenen Methylester von X-1 zeigt einen Molekülpeak mit der Masse 470. Weitere Peaks sind 189 ,207 ,220 ,233 und 262 (Abb.2.16.). Dieses Massenspektrum ist identisch mit dem Spektrum von Betulinsäuremethylester,wie es Budzikiewicz et al. (1963) berichtet hatten.Das Resonanzsignal bei 3,65 ppm im ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 2.17.) des X-1-Reaktionsprodukts bestätigt das Vorhandensein einer Methylestergruppierung.
Der engultigen Beweis für die Auwesenheit einer Carboxyl - gruppe liefert das ^{13}C-NMR-Spektrum (178,8 ppm).Außerdem treten Resonanzsignale für eine - C - OH - (78,2 ppm) und eine $CH_2 = C\langle$ -Gruppe (151,3 und 109,9 ppm) auf, die ebenfalls charakteristisch fur Lupan-Derivate sind (siehe Tabelle 2.7., Abb.2.18.).Das erhaltene Spektrum stimmt mit der Literaturangaben überin (Sholichin et al.,1980 ;Wenkert et al.,1978).
Um die sterische Konfiguration der Substitionen am Ring E aufzuklären, wurden CD-Spektren aufgenommen ;CD-Spektren erhaltenen für Betulinsäure und die Subtanz X-1 wurden fast identisch.
Auch die mit einer authentischen Proben von

Tabelle 2.5.Fragmentierungsmuster der Triterpen F-1,F-2,F-4 u.X-1.

Bruchstücke *	F-1	F-1-Acetat	F-2	F-2-Acetat
R_1	H	Ac.	H	Ac.
R_2	CH_3	CH_3	CHO	CHO
1.M^+	426 (5+)**	468 (4+)**	440 (3+)**	482 (1+)**
2.M-Me.	411 (3+)	453 (2+)	425 (1+)	467 (1+)
3.M-Me.-R_1OH	393 (2+)	393 (1+)	407 (1+)	407 (1+)
4.M-R_1OH	408 (1+)	408 (1+)	422 (1+)	422 (1+)
5.a	207 (3+)	249 (2+)	207 (5+)	249 (1+)
6.b	220 (2+)	262 (1+)	220 (2+)	262 (1+)
7.c	189 (3+)	189 (5+)	203 (3+)	203 (2+)
8.d	218 (3+)	218 (3+)	232 (2+)	232 (1+)
9.a-R_1OH	189 (3+)	189 (5+)	189 (5+)	189 (5+)
10.M-CHC	-	-	411 (2+)	453 (1+)
11.M-CO	-	-	412 (2+)	454 (1+)
12.M-CO-Me.	-	-	397 (1+)	439 (1+)

* : siehe Abb.2.10.

Tabelle 2.5. (Fortsetzung)

	F-4	F-4 Acetat	X-1	X-1-Acetat	X-1-Methyl-ester
	H	Ac.	H	Ac.	H
	CH_2OH	CH_2OAc.	COOH	COOH	COOMe
1.	442 (3+)	526 (1+)	456 (3+)	498 (1+)	470 (1+)
2.	427 (1+)	511 (1+)	441 (1+)	483 (1+)	455 (1+)
3.	409 (1+)	451 (1+)	423 (1+)	423 (1+)	437 (1+)
4.	424 (1+)	466 (4+)	438 (2+)	438 (2+)	452 (1+)
5.	207 (5+)	249 (1+)	207 (3+)	249 (1+)	207 (1+)
6.	220 (2+)	262 (1+)	220 (1+)	262 (1+)	220 (2+)
7.	205 (4+)	247 (1+)	219 (1+)	219 (1+)	233 (1+)
8.	234 (3+)	276 (1+)	248 (3+)	248 (2+)	262 (2+)
9.	189 (5+)	189 (5+)	189 (5+)	189 (5+)	189 (5+)
⋮					
13. M-CH_2OH	411 (4+)	-	-	-	-
14. M-CH_2OAc.	-	453 (1+)	-	-	-
15. M-COOH	-	-	411 (1+)	453 (1+)	-
16. M-CO-H_2O	-	-	410 (1+)	452 (1+)	-
17. M-COOMe.	-	-	-	-	411 (1+)

** : siehe Tabelle 2.9.

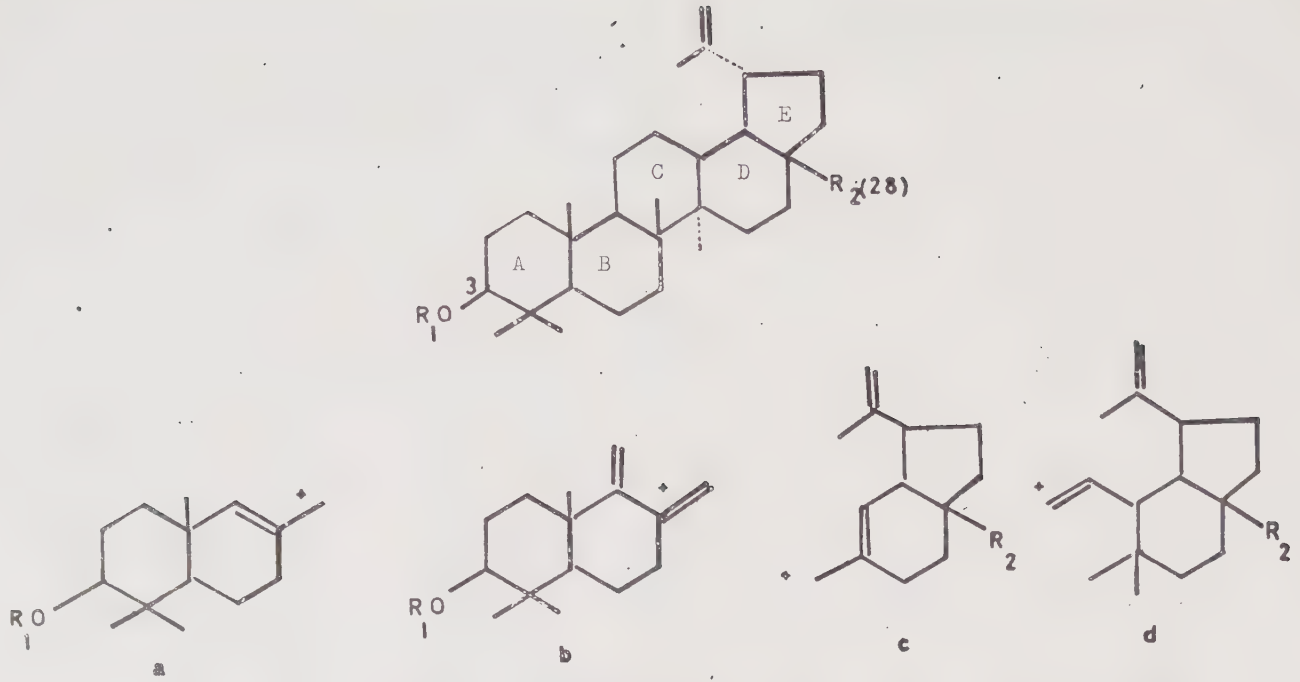
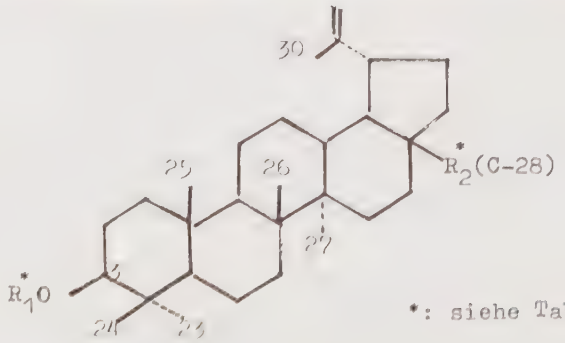


Abb.2.10. Massenspektroskopische Fragmentierungsbruchstücke von Lupanen.

Tabelle 2.6. ^{1}H-Chemische Verschiebungen von Methylgruppen der Lupanreihe.

	δ, ppm								
	F-1	F-1-Ac.	F-2	F-2-Ac.	F-4	F-4-Ac.	X-1	X-1-Ac.	X-1-Me.-ester
C -23	0,74	0,82	0,73	0,82	0,74	0,82	0,73	0,82	0,73
C -24	0,81	0,82	0,80	0,82	0,80	0,82	0,80	0,82	0,80
C -25	0,95	0,82	0,95	0,82	0,95	0,82	0,95	0,82	0,95
C -26	1,01	1,01	0,90	0,90	1,01	1,01	0,92	0,92	0,90
C -27	0,93	0,92	0,95	0,95	0,95	0,95	0.95	0,95	0,95
C -28	0,77	0,77	-	-	-	-	-	-	-
C -30	1,66	1,66	1,66	1,66	1,66	1,66	1,66	1,66	1,66
C -3(Ac.)	-	2,02	-	2,02	-	2,02	-	2,02	-
C -28(Ac.)	-	-	-	-	-	2,05	-	-	-



*: siehe Tabelle 2.5.

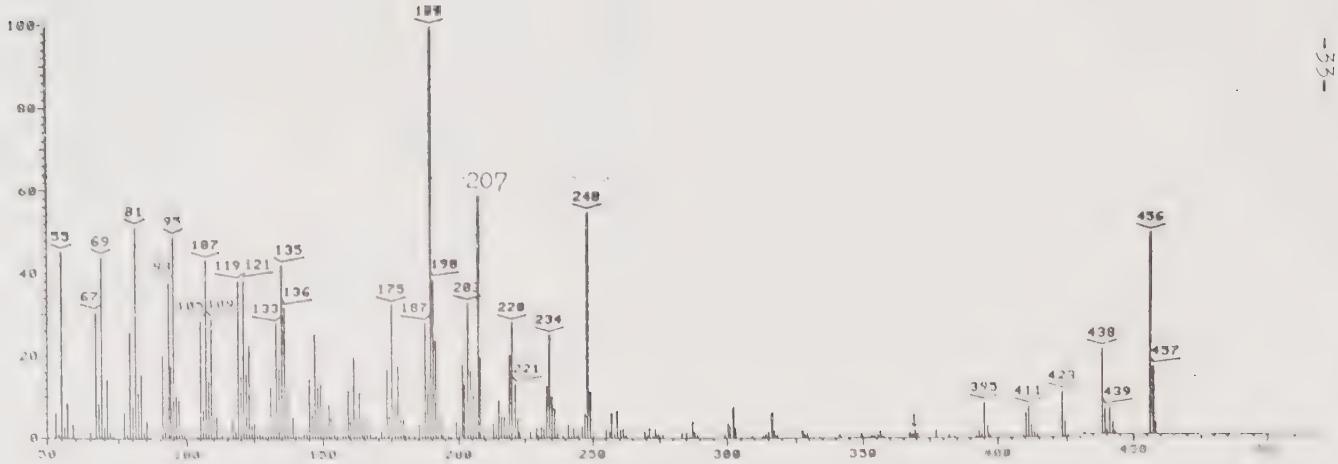


Abb.2.11.Massenspektrum von X-1, Ionisierungsenergie: 70 eV.

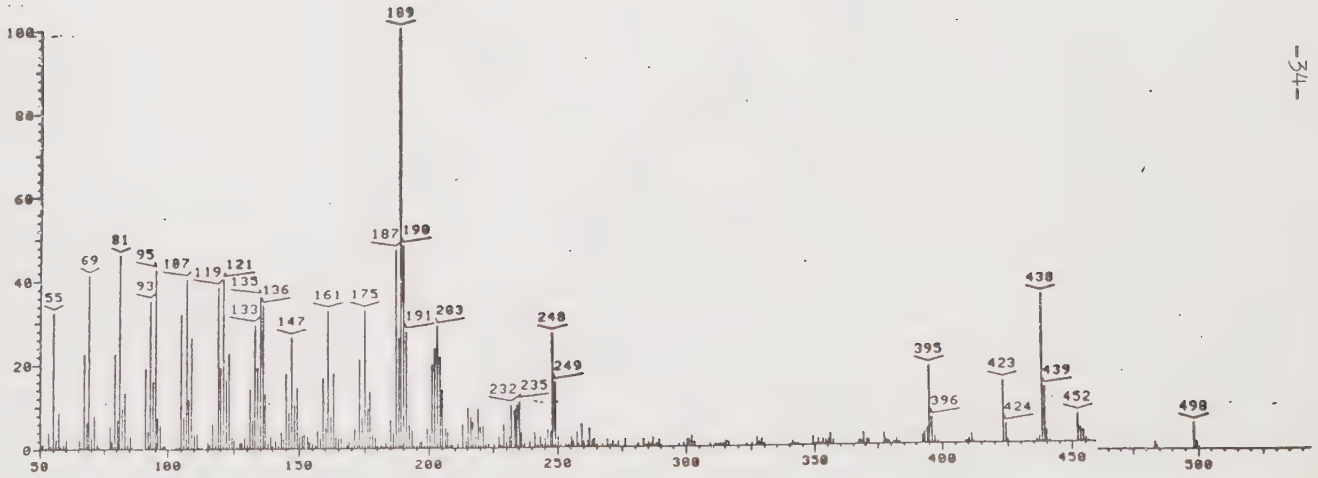


Abb.2.12. Massenspektrum von X-1-Acetat, Ionisierungsenergie: 70 eV.

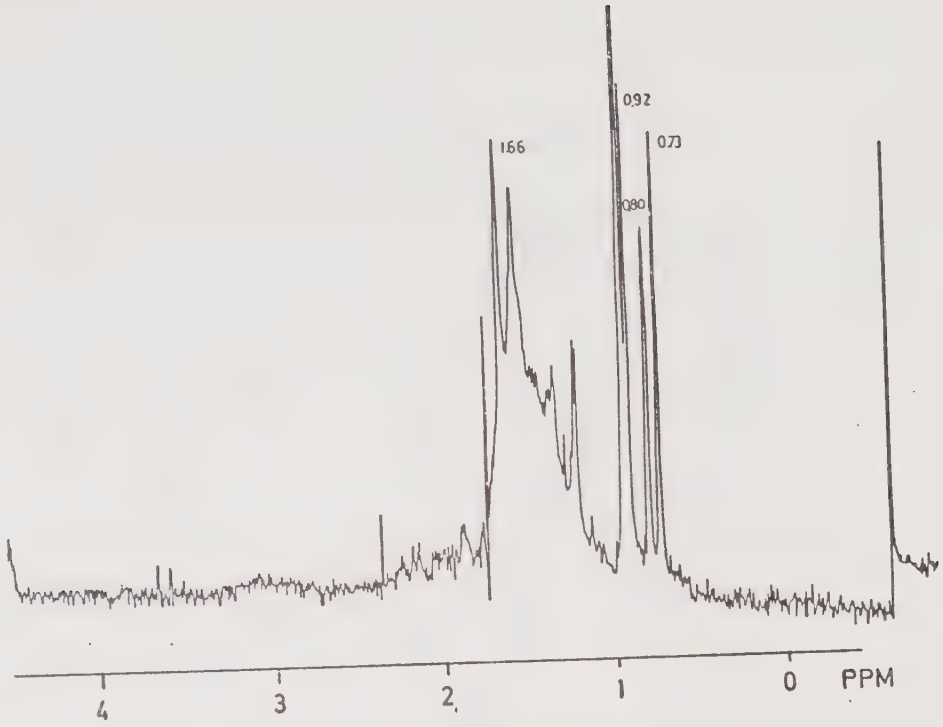


Abb.2.13. ^{1}H-NMR-Spektrum von X-1, $CDCl_3$, 90 MHz.

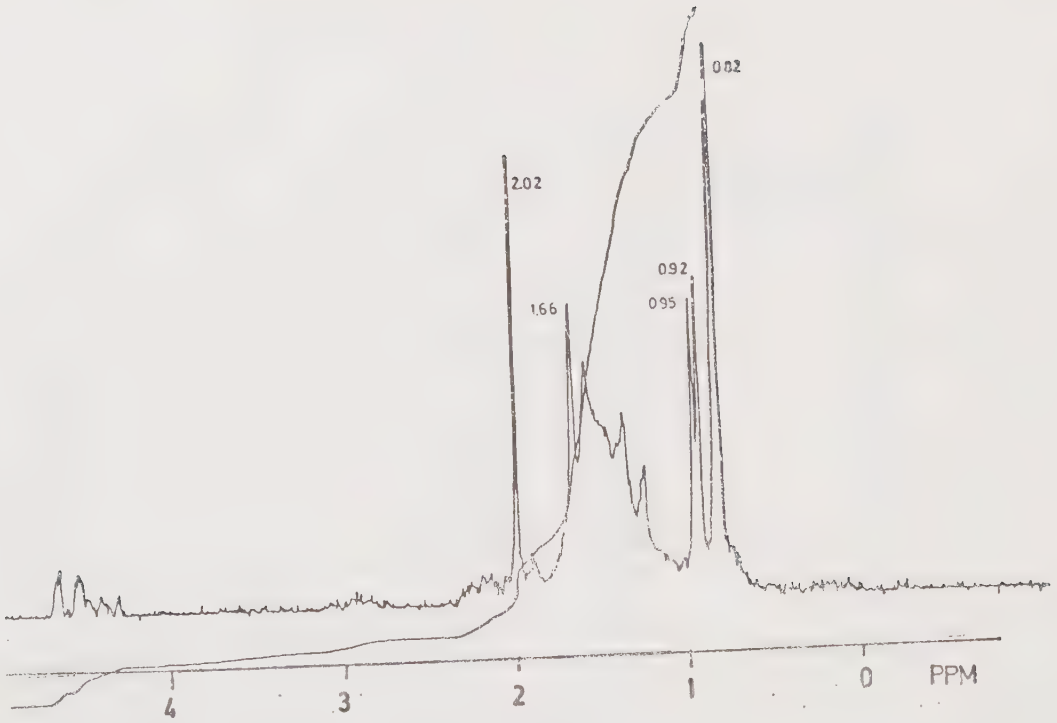


Abb.2.14. ^{1}H-NMR-Spektrum von X-1-Acetat, $CDCl_3$, 90 MHz.

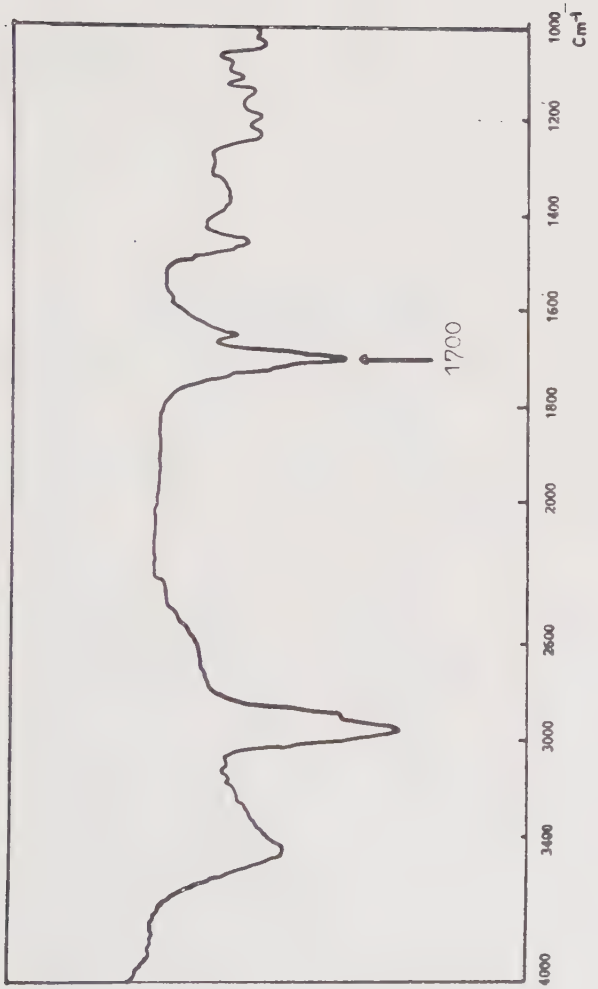


Abb.2.15. IR-Spektrum von X-1(KBr).

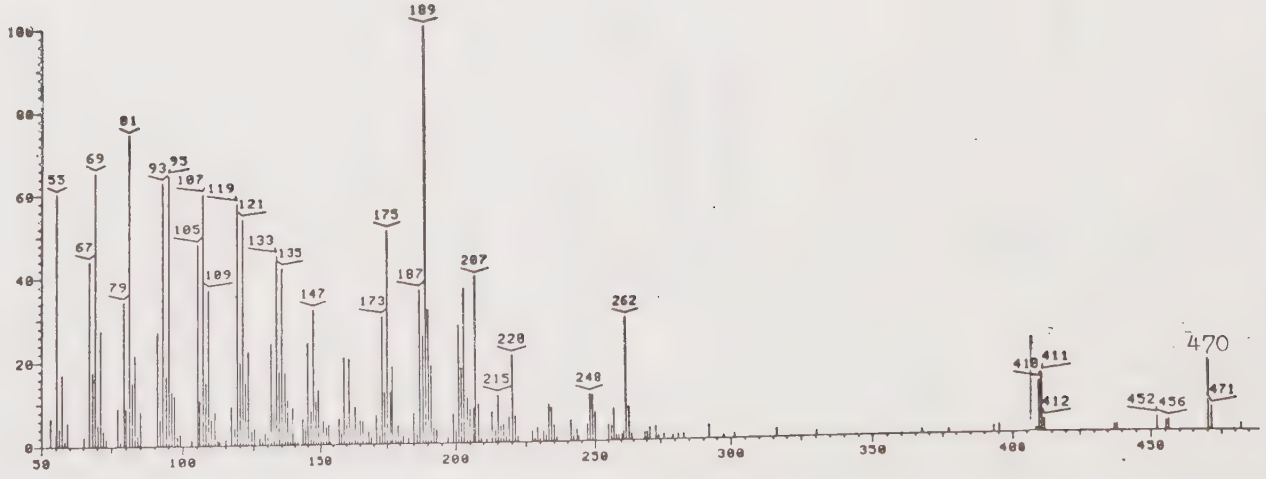


Abb. 2.16. Massenspektrum von X-1- Methylester, Ionisierungenergie : 70 eV.

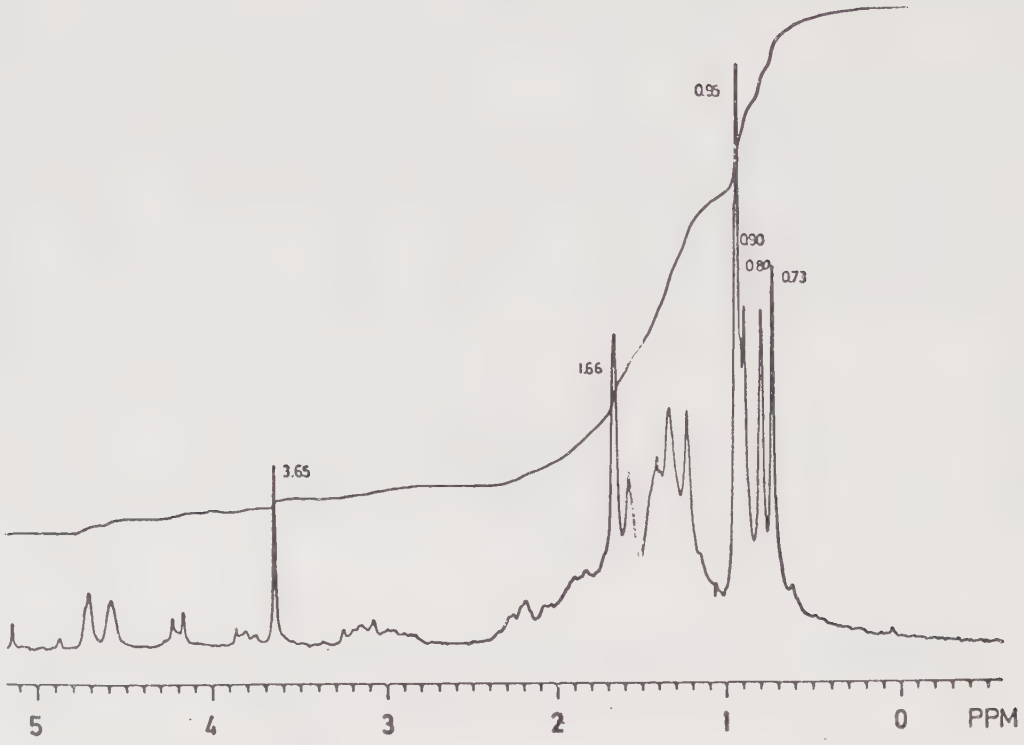
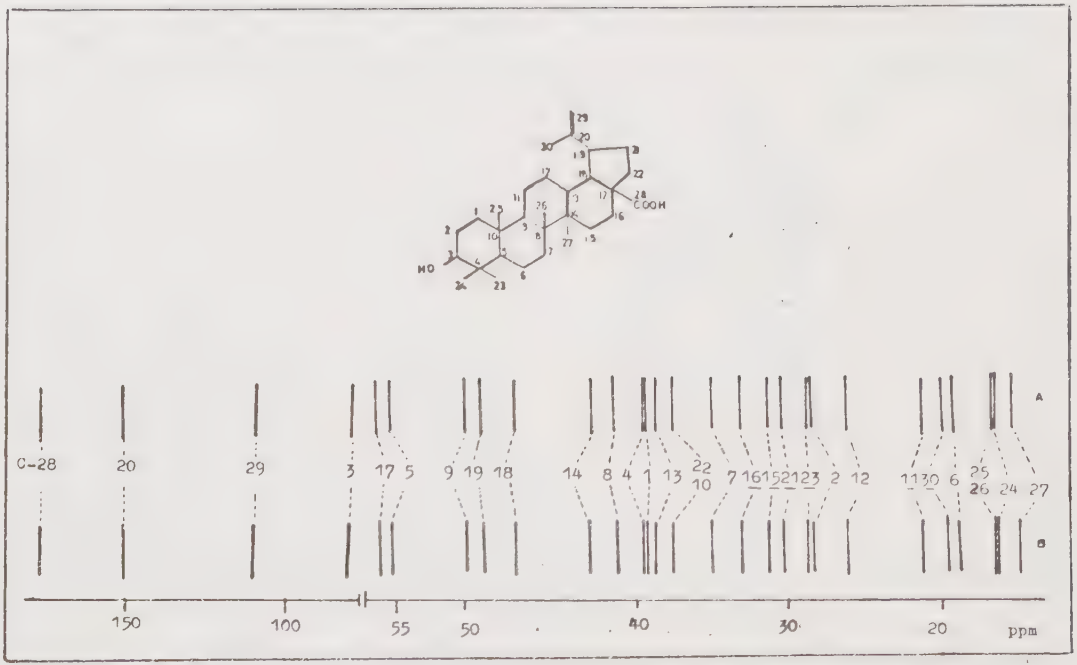


Abb.2.17. ^{1}H-NMR-Spektrum von X-1-Methylester, $CDCl_3$, 90 MHz.



...13C-Chemische Verschiebungen von X-1(a) und Betulinsäure (b), Pyridin - d_5, 25,14 MHz.

Tabelle 2.7. Chemische-Verschiebungen im ^{13}C-NMR-Spektren

	Betulin (Lit.)*	F-4 +	Betulinsäure (Lit.)*	X-1 ++
C -1	38,8 (38,7)	38,7	39,3 (39,0)	39,3
C -2	27,5 (27,4)	27,4	28,3 (27,6)	28,4
C -3	78,9 (79,1)	79,0	78,2 (78,2)	78,2
C -4	38,9 (38,8)	38,9	39,5 (39,0)	39,6
C -5	55,3 (55,3)	55,3	55,9 (55,0)	56,0
C -6	18,3 (18,3)	18,3	18,7 (18,4)	18,9
C -7	34,3 (34,3)	34,3	34,8 (34,5)	34,9
C -8	41,0 (41,0)	40,9	41,1 (40,8)	41,2
C -9	50,5 (50,5)	50,4	51,0 (50,7)	51,0
C -10	37,2 (37,3)	37,2	37,5 (37,3)	37,6
C -11	20,9 (20,9)	20,8	21,2 (21,0)	21,3
C -12	25,3 (25,2)	25,3	26,1 (25,6)	26,2
C -13	37,4 (37,2)	37,4	38,6 (38,2)	38,7
C -14	42,8 (42,8)	42,8	43,0 (42,5)	42,9
C -15	27,1 (27,1)	27,1	31,0 (30,8)	31,3
C -16	29,3 (29,2)	29,2	32,9 (32,6)	32,9
C -17	47,8 (47,9)	47,8	56,6 (56,3)	56,7
C -18	47,8 (47,9)	47,8	47,8 (47,1)	47,8
C -19	48,8 (48,8)	48,8	49,8 (49,4)	49,9
C -20	150,4(150,5)	150 ,5	151,2 (150,9)	151,3
C -21	29,8 (29,8)	29,8	30,3 (29,9)	30,4
C -22	34,0 (34,0)	34,0	37,5 (37,3)	37,6
C -23	28,0 (28,1)	28,0	28,6 (28,2)	28,7
C -24	15,4 (15,4)	15,4	16,3 (15,6)	16,4
C -25	16,1 (16,1)	16,1	16,4 (16,1)	16,5
C -26	16,1 (16,1)	16,1	16,4 (16,1)	16,5
C -27	14,8 (14,8)	14,8	14,8 (14,7)	15,0
C -28	60,6 (60,6)	60,6	178,9 (178,9)	178,8
C -29	109,6(109,7)	109,7	109,9 (109,4)	109,9
C -30	19,1 (19,1)	19,1	19,3 (19,4)	19,5

+ : in $CDCl_3$; ++ : in Pyridin -d_5

* : Sholichin et al.,1980

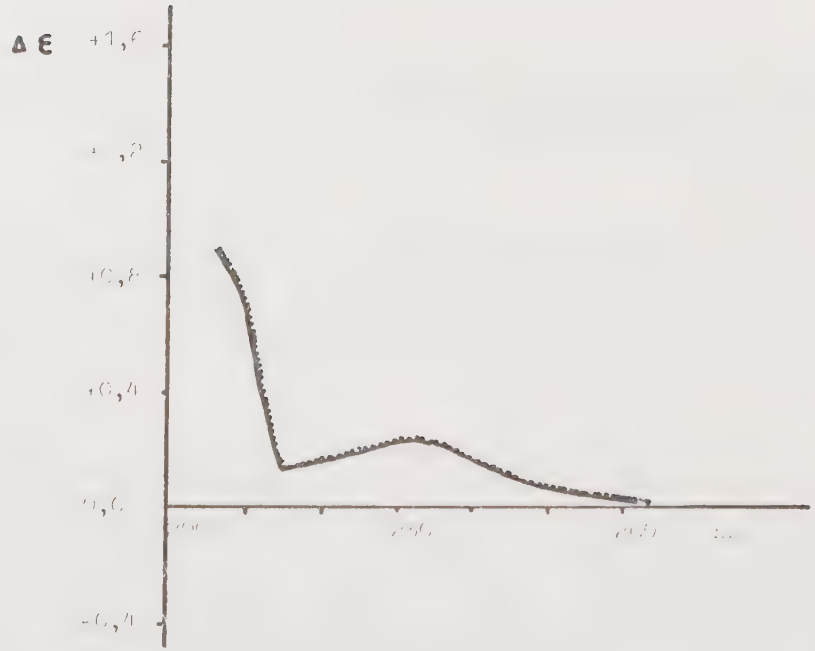


Abb. 2: Cu-Spektren von $Z = 1$ (.....) und $Z = 2$ (————) in Wasser.

Betulinsäure (Fa.Roth) erstellten Spektren (^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, MS) sind identisch mit die von X-4 aufgenommen wurden. Damit ist eindeutig bewiesen, daß es sich bei Substanz X-4 um Betulinsäure handelt.

2.9.6.Strukturaufklärung von F-4.

Die Massenspektren und ^{1}H-NMR-Spektren von F-4 bzw.F-4-Acetat (siehe Tabelle 2.5.,2.6.;Abb.2.20.,2.21.,2.22.,2.23.) weisen die oben für X-4 beschriebenen Charateristika für einen Vertreter der Lupan-Reihe auf.Das Molekülargewicht beträgt 442. Peaks mit m/e-Werten von 526 (442+2x42),249 (207+42),262 (220+42) und 453 (411+42) zeigen die Präsenz von zwei OH-Gruppen, was auch durch Resonanzsignale bei 2,02 und 2,05 ppm im ^{1}H-NMR-Spektren von F-4-Acetat bestätigt wird(Lehn und Ourrison ,1962). Die von einer authentischen Probe von Betulin (Fa.Sigma) aufgenommenen Massen- ,^{1}H-NMR- ,^{13}C-NMR-Spektren sind mit denen von F-4 identisch ,so daß es sich bei dieser Substanz um das Erstere handeln muß.

2.9.7.Strukturaufklärung von F-2.

Die Massenspektren und ^{1}H-NMR-Spektren von F-2 bzw.F-2-Acetat (siehe Tabelle 2.5.,2.6.;Abb.2.25.,2.26.,2.27.,2.28.) zeigen, daß F-2 ein Vertreter der Lupan -Reihe mit einer OH-Gruppe an C-3 und einem Molekülargewicht von 440 ist.
Das IR-Spektrum von F-2 (Abb.2.29.) weist Absorptionsbanden bei 1715 cm^{-1}(>C = O),1690,890 cm^{-1}(-C = C-),3450 cm^{-1}(-OH) auf.In den Massenspektren treten Signale mit m/e-Werten von 411 (453),412(454),397(439),203 und 232 auf.
Diese Peaks zusammen mit dem IR-Spektrum deuten auf eine Aldehyd-Gruppe an C-28 des Moleküls hin.
Die Resonanz bei 9,65 ppm im ^{1}H-NMR-Spektrum (400 MHz) bestätigte dies (siehe Abb.2.30.).
Ein Vergleich der Massenspektren mit Literaturangaben ergibt eine

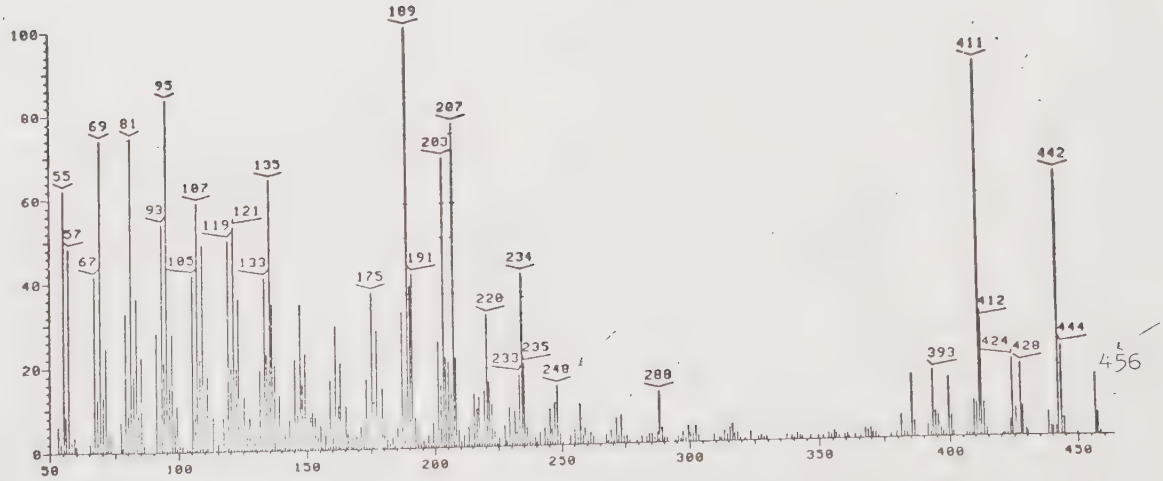


Abb.2.20.Massenspektrum von F-4,Ionisierungsenergie : 70 eV; Peaks mit den m/e-Werten 456 und 248 stammen von F-4 als Verunreinigung.

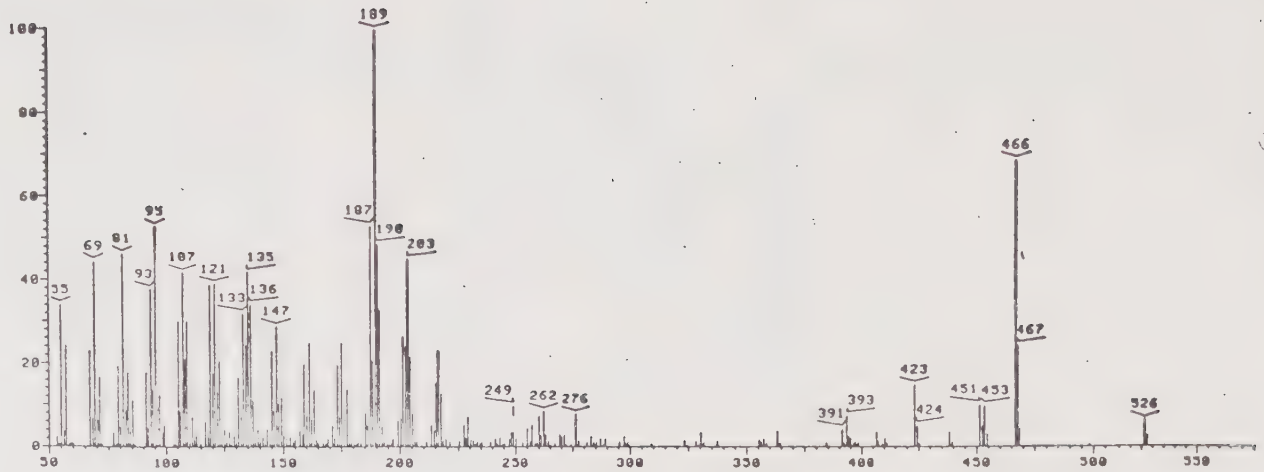


Abb.2.21.Massenspektrum von F-4-Acetat,Ionisier[illegible]

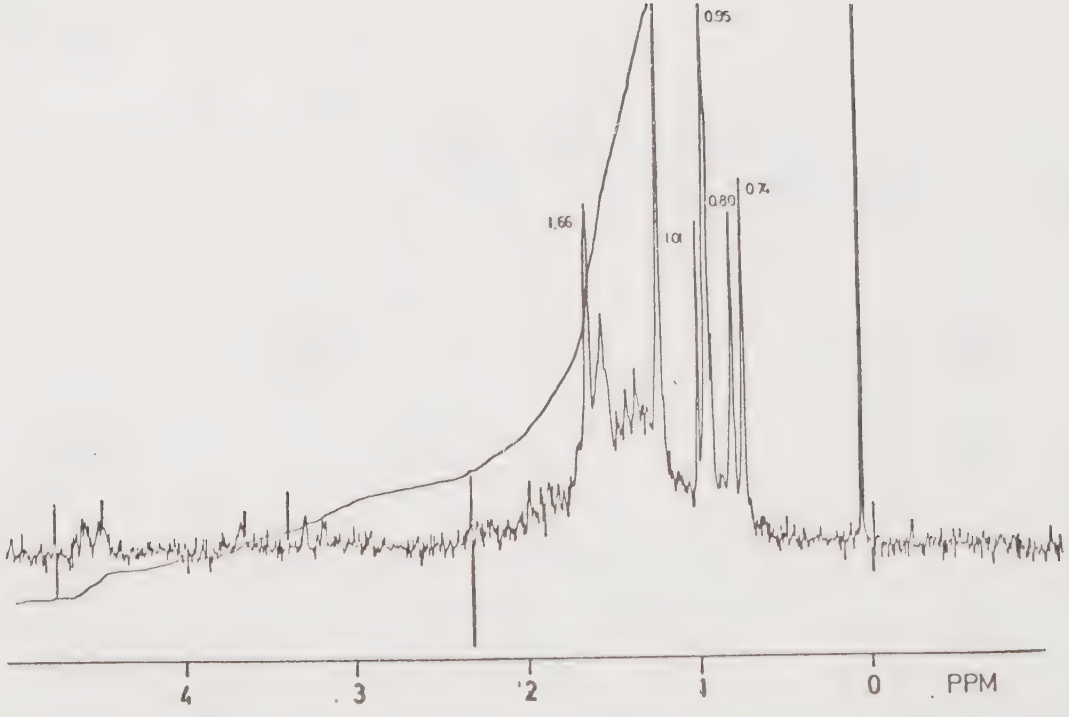


Abb. 2.22. ^{1}H-NMR-Spektrum von F-4 ,CDCl$_3$, 90 MHz.

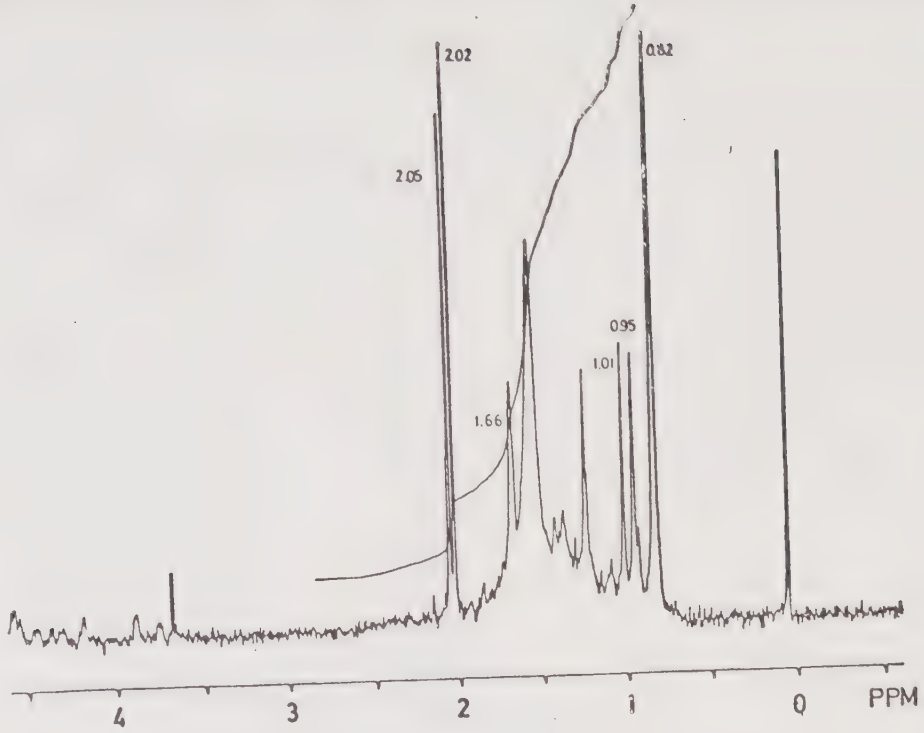


Abb. ?.23. ^{1}H-NMR-Spektrum von F-4-Acetat, $CDCl_3$, 90 MHz .

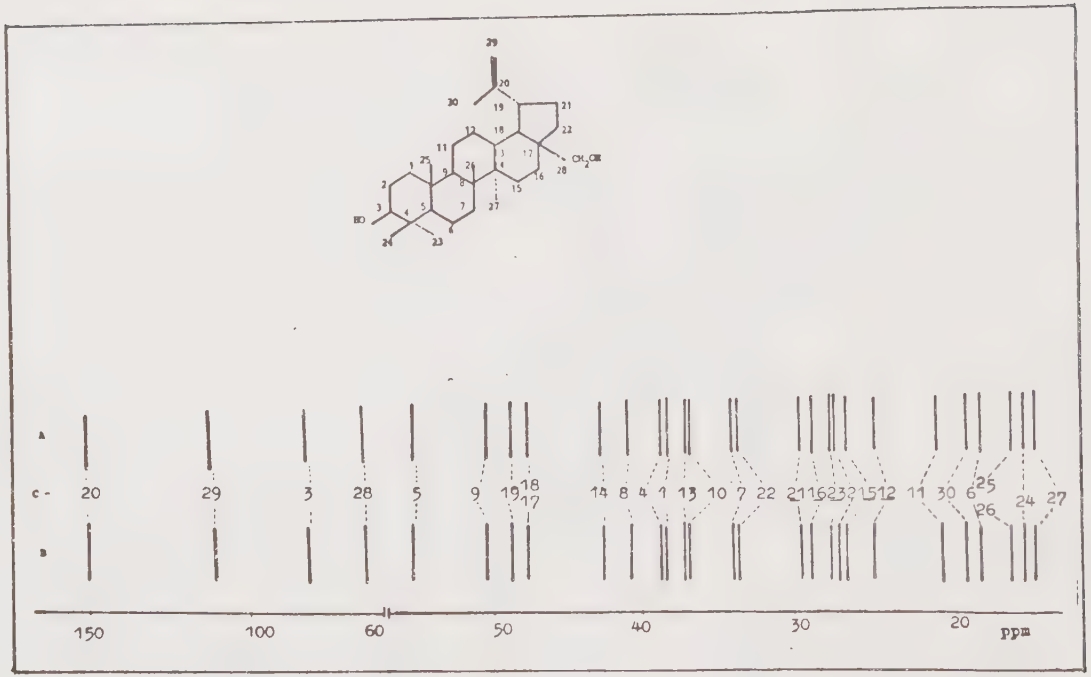


Abb.2.24. ^{13}C-Chemische-Verschiebungen von F-4 (A) und Betulin (B), $CDCl_3$, 20,11 MHz.

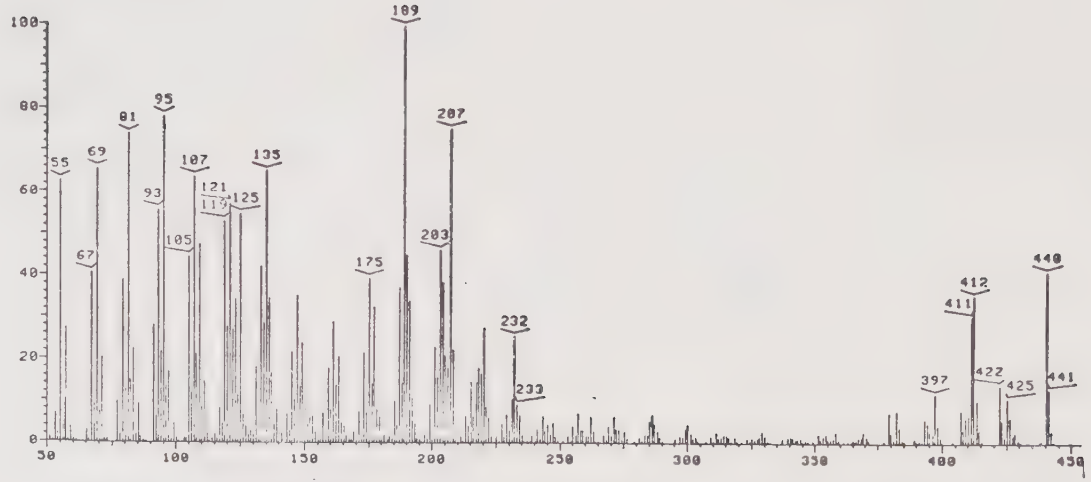


Abb.2.25. Massenspektrum von F-2, Ionisierungenergie : 70 eV .

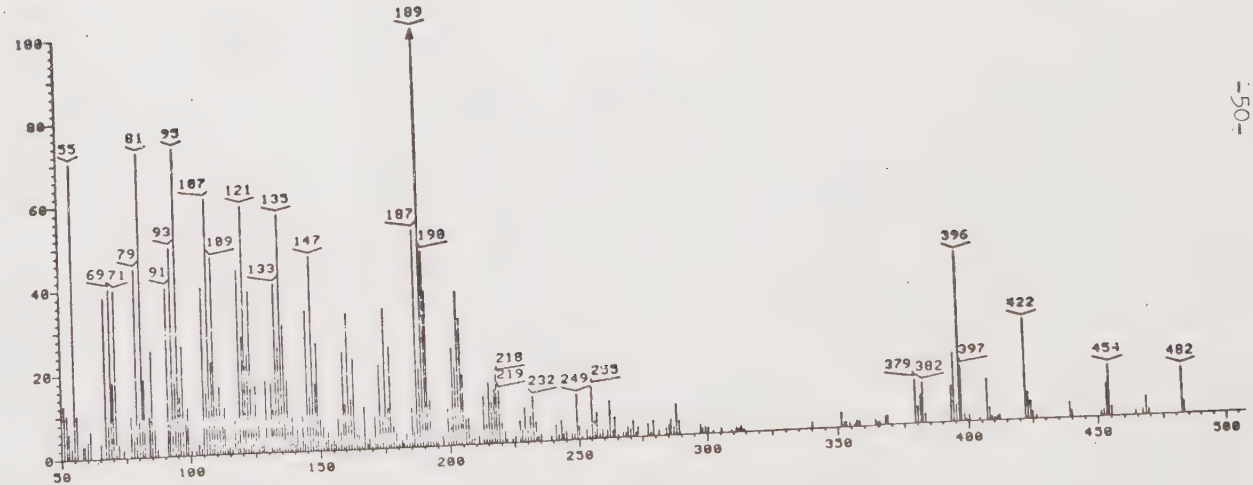


Abb.2.26.Massenspektrum von F-2-Acetat ,Ionisierungenergie :70 eV.

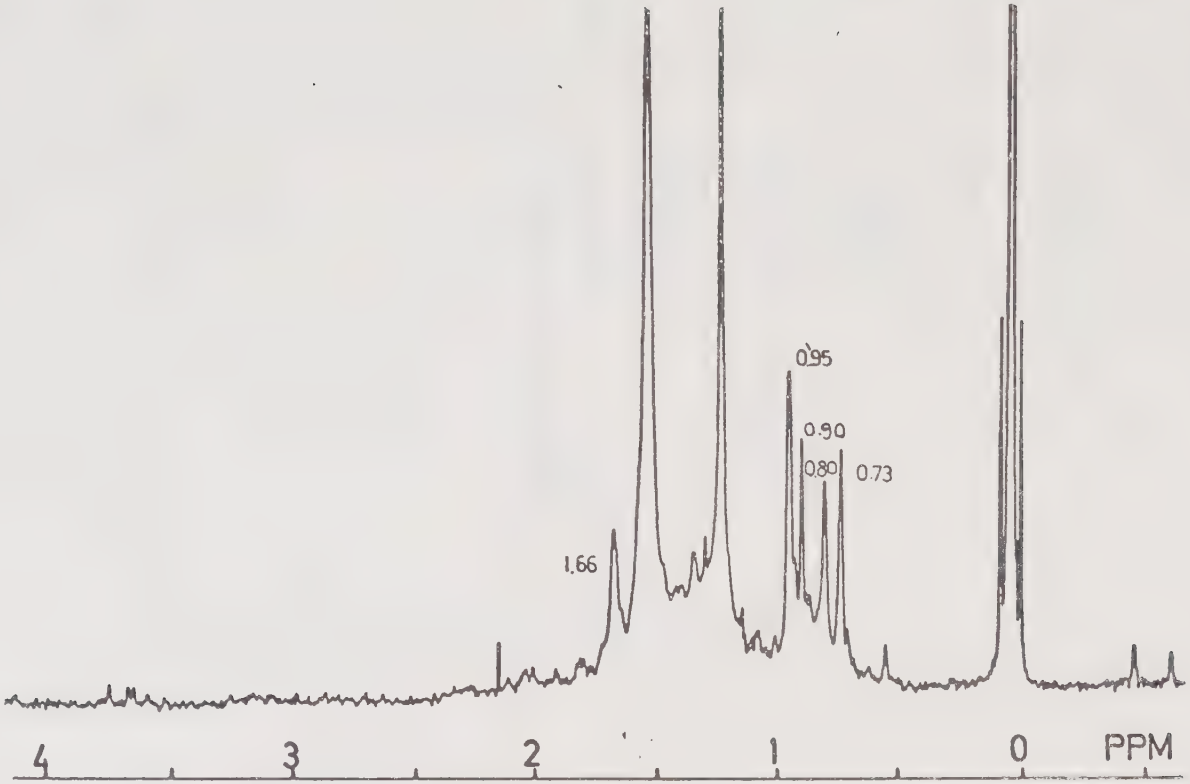


Abb.2.27. ^{1}H-NMR-Spektrum von F-2 ,$CDCl_3$, 90 MHz.

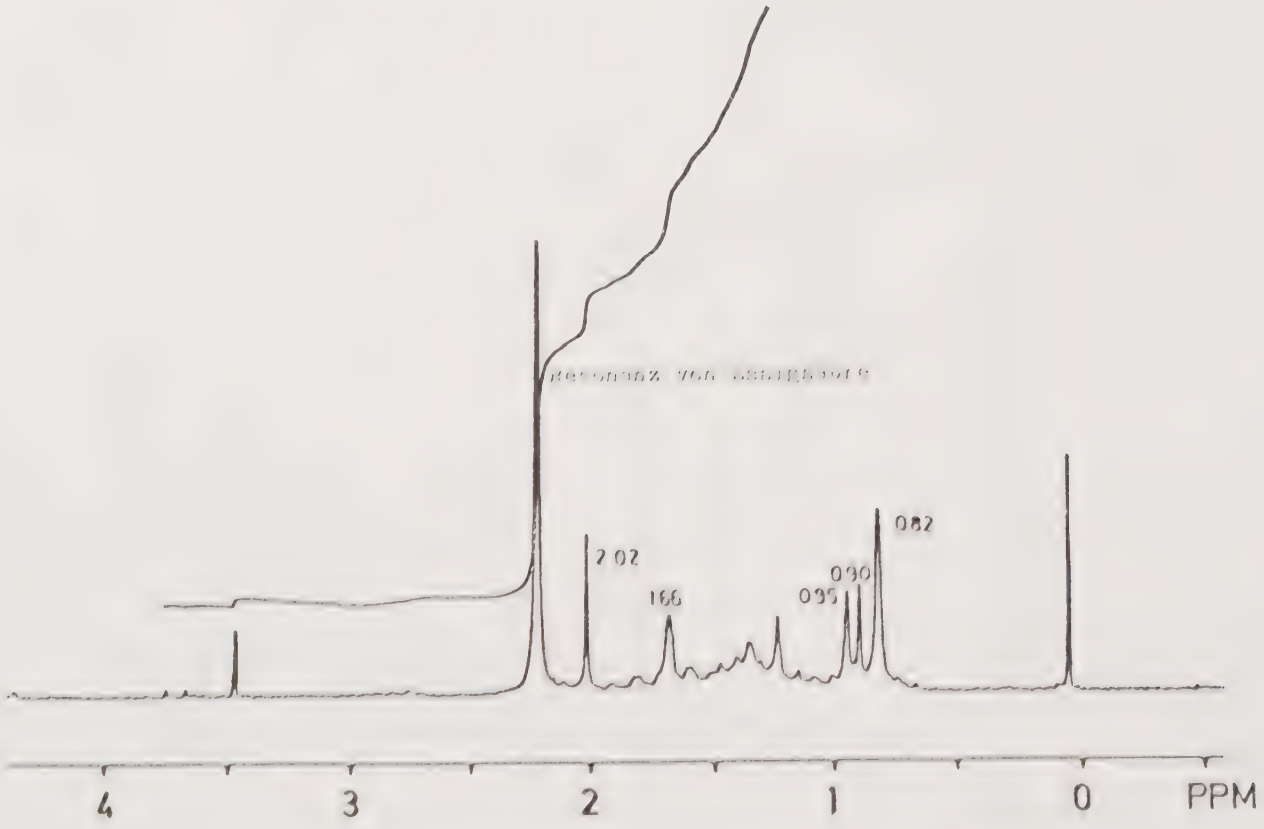


Abb.2.28.: ^{1}H-NMR-Spektrum von F-2-Acetat, $CDCl_3$, 90 MHz.

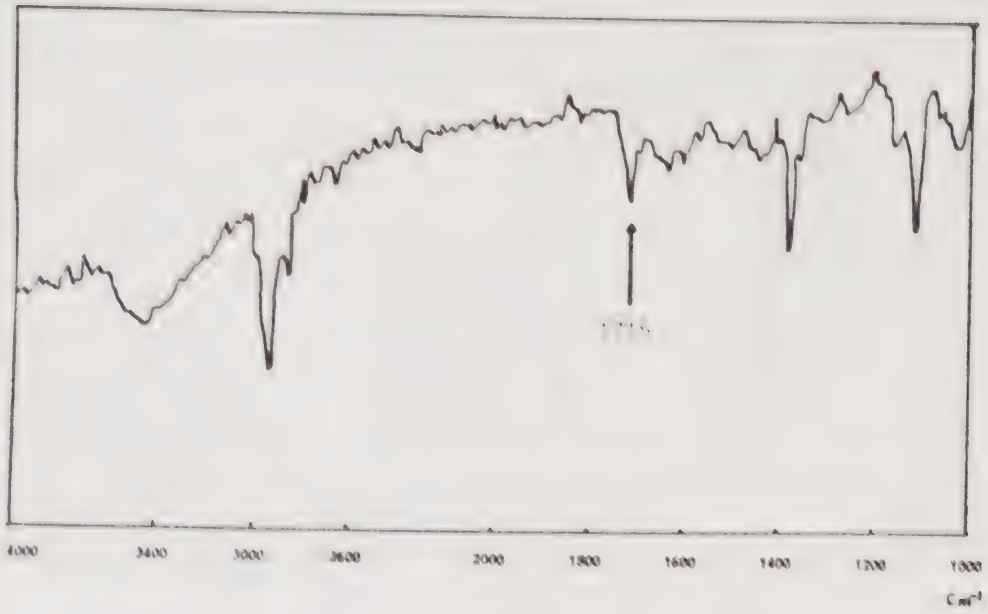


Abb.2.29.IR-Spektrum von F-2(KBr).

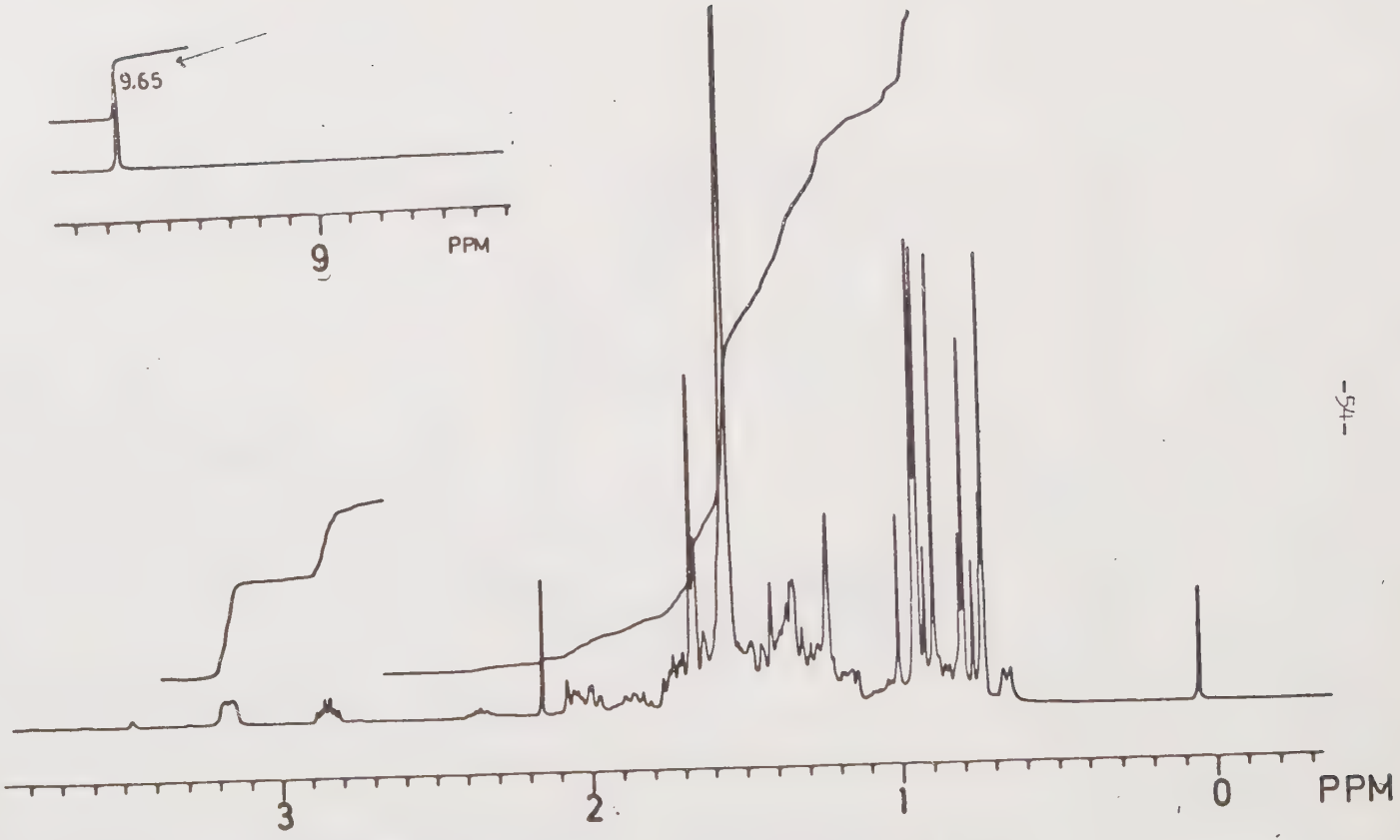


Abb.2.30. ^{1}H-NMR-Spektrum von F-1 u.F-2 (31% F-1 +69 % F-2), $CDCl_3$, 400 MHz.

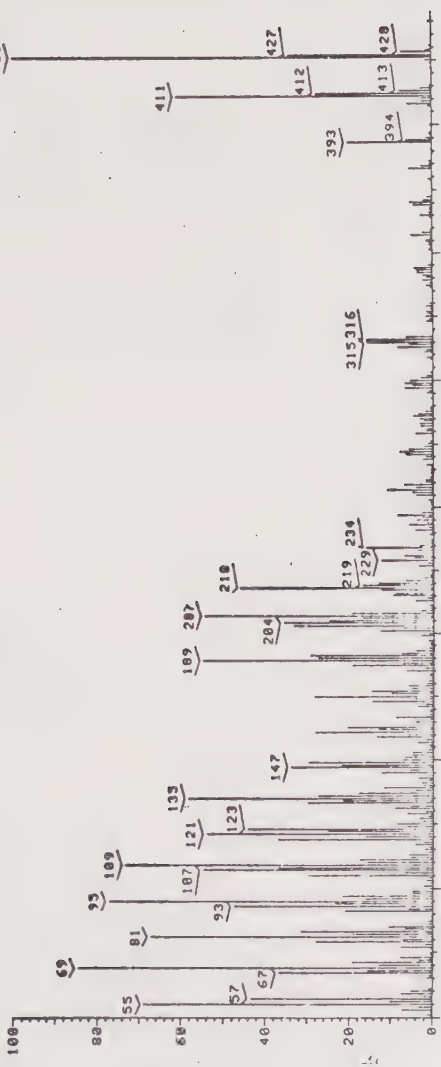


Abb.2.31.Massenspektrum von F-1,Ionisierungenergie:70 eV.

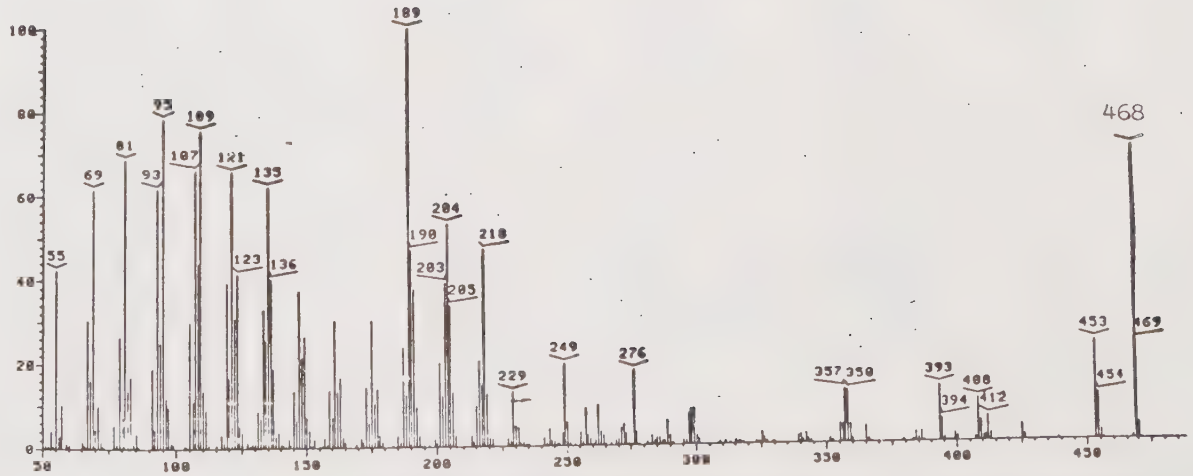


Abb.2.32.Massenspektrum von F-1-Acetat ,Ionisierungenergie:70 eV.

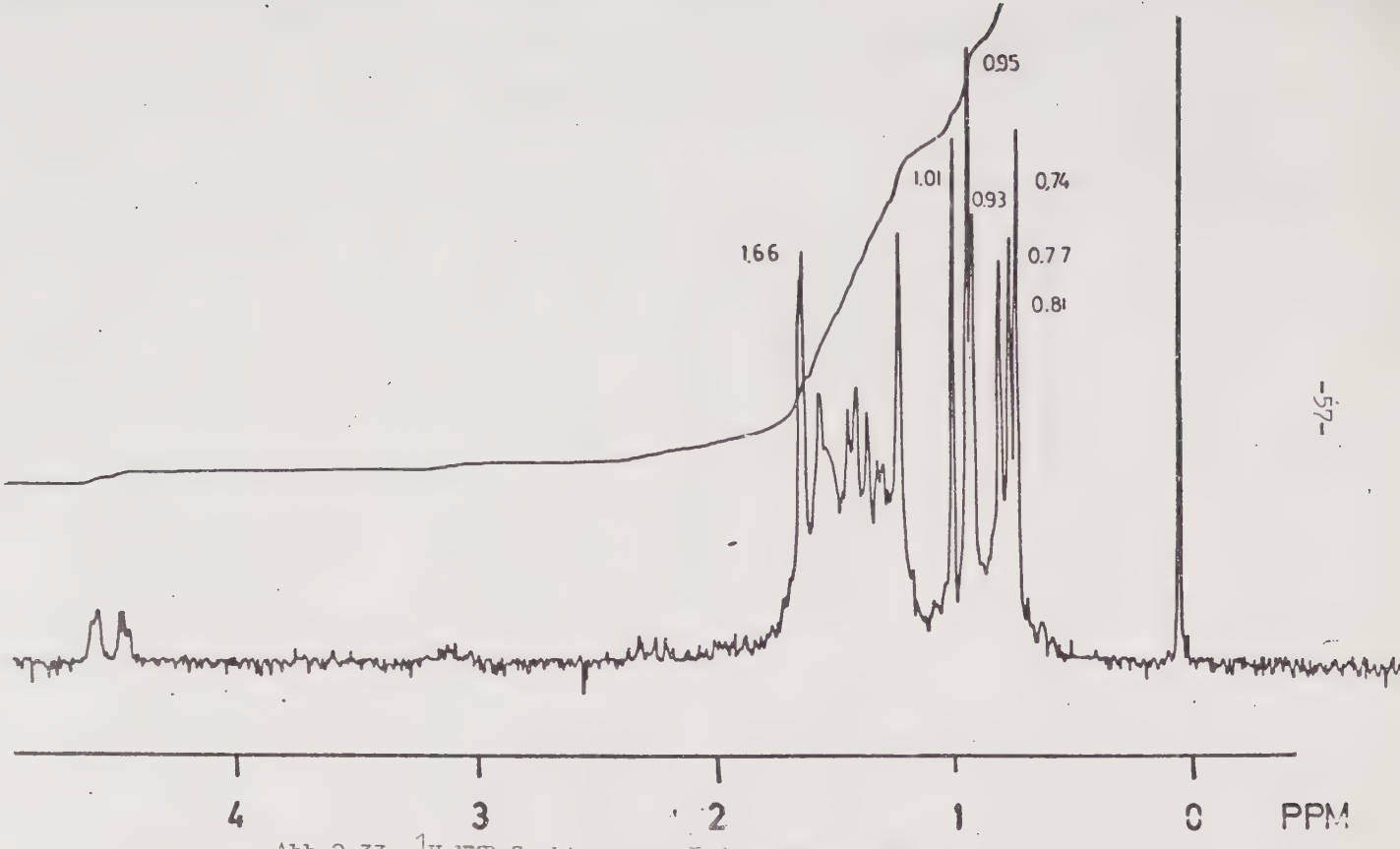


Abb.2.33. ^{1}H-NMR-Spektrum von F-1, $CDCl_3$, 90 MHz .

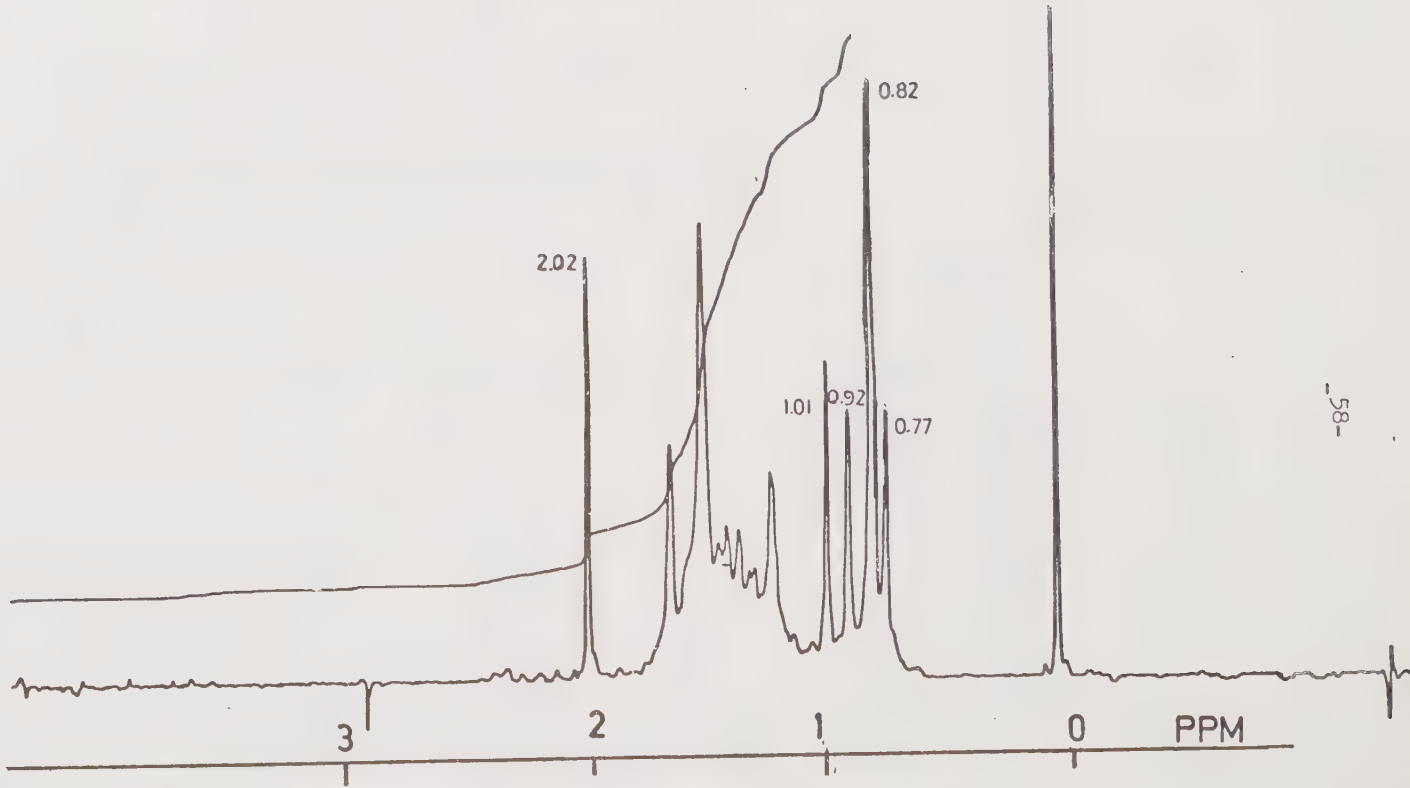


Abb.2.34. ^{1}H-NMR-Spektrum von F-1-Acetat, $CDCl_3$, 90 MHz.

weitgehende Übereintimmung von F-2 mit Betulinaldehyd (Bhattacharyya et al.,1976) sowie ein identisches Bild für F-2-Acetat mit den von Ahmad (1982) gesammelten Daten von Betulinaldehyd-Acetat.
Aufgrund dieser Fakten wurde F-2 als Betulinaldehyd identifiziert.Die Menge an F-2 in Solanum wrightii-Kalluskulturen war zu gering, um F-2 isolieren zu können.Daher wurde die Identifizierung in diesem Fall mit Hilfe der GC-MS-Analyse durchgefuhrt (siehe 2.10.2.).

2.9.8.Strukturaufklärung von F-1.

Die Massenspektren und ^{1}H-NMR-Spektren von F-1 bzw.F-1-Acetat beweisen, daß auch F-1 ein Lupan-Derivat mit einem OH-Gruppe bei C-3 und einem Molekülgewicht von 426 ist.
Die Massenspektren von F-1 und F-1-Acetat weisen ein Fragment mit m/e-Wert von 218 auf, das dem Bruchstück d entspracht (Tabelle 2.5.; Abb.2.31, und 2.32.).Die ^{1}H-NMR-Spektren zeigen 7 Methyl-Gruppen bei 0,74 ,0,81 ,0,95 ,1,01 ,0,93 ,0,77 und 1,66 ppm (Tabelle 2.6.; Abb.2.33.,2.34.).Dies bedeutet, daß im Vergleich zu F-2 ,F-4 und X-1 je eine zusätliche Methylgruppe enthalten ist (Methyl-Gruppe mit der Resonanz 0,77 ppm).
Diese Spektren beweisen ,daß F-1 bei C-28 ein Methyl-Gruppe besitzt.Die Spektren der isolierten Subtanz F-1 sind identisch mit den Spektren von Lupeol, die Itoh et al. (1973)[a] und Lehn, Ourrison (1962) publiziert hatten.Somit wird Subtanz F-1 als Lupeol identifiziert.

2.9.9.Diskussion.

Es gibt kaum Literatur über Isolierung und Identifizierung vom Lupan -Derivaten in pflanzlichen Zellkulturen (Nickell,1980 ; Staba. 1980).Dagegen liegen zalreiche Berichte über Isolierung und Identifizierung solcher Verbindungen (Lupeol,Betulin,Betulinsäure) aus Pflanzen aus den Familie Betulaceae ,Rhamnaceae, Apocynaceae,Ebenaceae,Myrtaceae, Celantaceae u.a.(Hegnauer 1964; 1966 ;1969 und 1973) vor.

Ein weiteres Lupan -Derivat, Betulinaldehyd, konnte bis heute nur in Platanus occidentalis ,Platanus hybrida ,Alangium lamarekii und Sarracenia flava nachgewiesen werden (Nakrashi et al, 1968 ;Bhattacharyya et al, 1976 ;Ahmad, 1982).
Bei den früher in der Familie der Solanaceae gefundenen Triterpen handelt es sich ausschließlich um Oleanol- und Ursolsäure (Hegnauer, 1973).
Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurden in Zellkulturen von Solanum laciniatum und Solanum wrightii die Lupan-Derivate Lupeol,Betulin ,Betulinaldehyd, Betulinsäure isoliert und identifiziert.Diese Verbindungen fehlten dagegen in Zellkulturen von Costus speciosus.Der Nachweis von Lupeol in Zellkulturen war zuerst Heble et al. (1971) gelungen.

Die enge biogenetische Zusammengehörikeit der Lupane und Steroide zeigt sich darin, daß die beiden stets gemeinsam auftreten. Die erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Biosynthesewege der Steroid und Triterpene in den Zellkulturen der beiden untersuchten Solanumarten fast identisch sind, denn die Inhaltstoffmuster sind sehr ähnlich.

Die Massenspektren zeigen , daß in allen Lupan -Derivaten , die aus Zellkulturen isoliert werden konnten, charakteristische Peaks mit m/e -Werten von 207 ,249 (Acetat-Derivaten),189,220 und 262 (Acetat-Derivaten) auftreten, wie Budzikiewicz et al. (1962) berichtet hatten. Die Bruhstücke c und d geben einen Hinweis auf den jeweiligen Substituent an C-28.
Die ^{1}H-NMR-Spektren von Betulinaldehyd und Betulinsäure zeigen eine Resonanz bei 0,90 -0,92 ppm aufgrund der Methyl-Gruppe bei C-26;dies bedeutet, daß im Vergleich zu Lupeol und Betulin eine diamagnetische Verschiebung von 0,09 -0,11 ppm vorliegt.
Die Anisotropie der Carbonyl-Gruppe bei C-28 von Betulinaldehyd und Betulinsäure verusacht eine stärkere Abschirmung der Methyl-Gruppe an C-26 (siehe Abb.2.35)

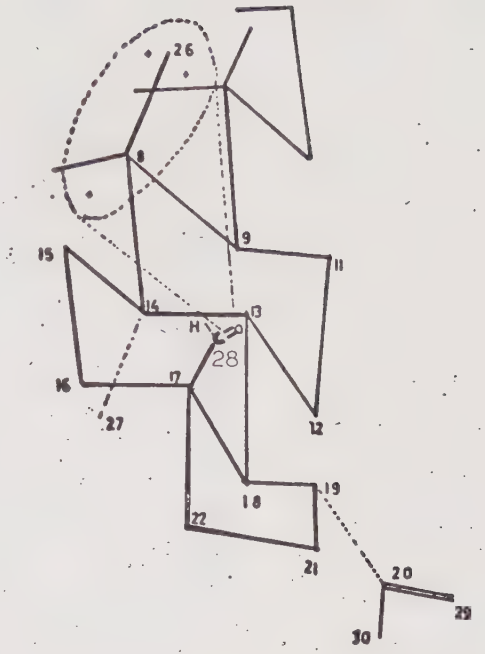


Abb.2.35.Abschirmung der Methyl-Gruppe (C-26)
von der Carbonyl-Gruppe bei C-28.

2.10. Strukturaufklärung von F-3.

Fraktion F-3 (siehe 2.9.1.) wurde auf einer präparativen DC-Platte und mit Hexan /Essigsäureethylester (8 /2) wie 2.9.1. weiterbearbeitet.

0,5 -1,0 mg des so isolierten Sterin-Gemisches wurde in 2 ml Chloroform gelöst und sofort für die GC-MS-Untersuchung verwendet.

2.10.1. TMS -Derivatisierung.

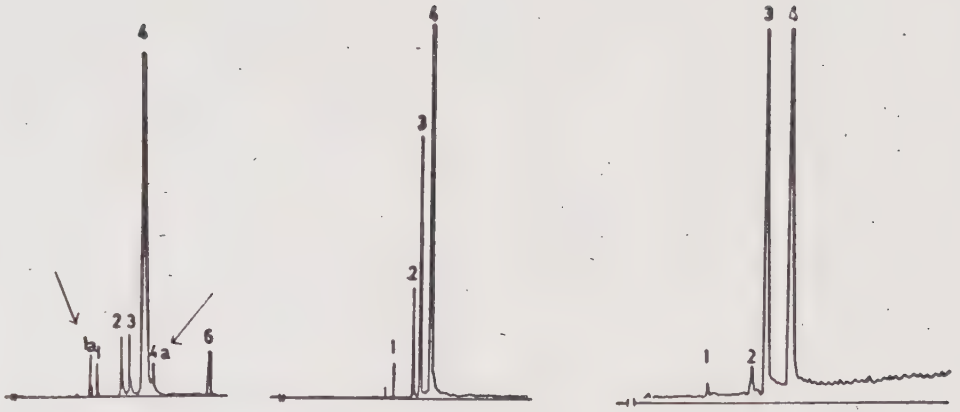
0,5 mg des isolierten Steringemisches wurde in 0,50 ml Pyridin gelöst , und mit 0,5 ml HMDS und 0,10 ml TMSC 24 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert (nach Glespach ,1974).
Danach wurde das Lösungsmittel durch Einblasen von N_2 dampft und der Rückstand in 2 ml Ethylacetat gelöst.Diese Lösung wurde für die GC-MS-Untersuchung verwendet.

2.10.2. GC -MS von F-3.

Die Massenspektren der Proben und der Vergleichssubtanz wurden mit einem GC-MS-Gerät vom Typ MAT 112s (Fa.Finnigan) unter folgenden Bedingungen aufgenommen :

Glaskapillarsäule : 20 m x 0,3 mm ,Temperaturprogramm : 200 - 280°C , 4° / min , Detektion :Totalionenstrom , Ionisierungenergie : 80 eV.

In Abb.2.36. sind die Gaschromatogramme (Kapillarsäule) des Sterolgemisches F-3 dargestellt.Die Peaks 1 und 4 des Gaschromatogramms der Abbildung 2.5.(Petroletherextrakt der Zellkulturen von Solanum laciniatum,Preparation F-3 ,siehe Tabelle 2.3.) wurden unter Verwendung der Kapillarsäule in die Peaks 1a und 4a aufgetrennt .
Die Massenspektren der Sterole 1,2,3,4 und 4a bzw.ihre TMS-Dirivaten sind in den Tabellen 2.8. und 2.9. und Abbildungen 2.36 bis 2.45. wiedergegeben.



S.laciniatum S.wrightii C.speciosus(Stengel)

Abb.2.36. Gaschromatogramm (Kapillarsäule) des Sterolgemisches F-3.

Die Sterole 1,2 und 4 hatten das gleiche Fragmentierungsmuster. Sie weisen Molekülpeaks mit m/e -Werten von 386 , 400 und 414 auf.
Für Δ^5- Sterole sind folgende Peaks der Spektren der drei Sterole charakteristisch (Knights, 1967 ;Brooks, 1973) : Sterol 1 : m/e : 301 ,275 ,247 ; Sterol 2 : m / e: 315 , 289 , 261 und Sterol 4 : m/e : 329 ,303 ,275.
Die TMS -Derivate zeigen folgenden chrakteristischen Peaks: Sterol 1 : m/e : 329 , Sterol 2 : m/e :343 und Sterol 4 : m/e :357.
Die Massenspektren der Vergleichssubstanzen Cholesterin(Fa.Sigma) Campesterin und Sitosterin (Fa.California Co. for Biochemical Research) bestätigen deren Identität mit den Sterolen 1 , 2 und 4.

Sterol 3 hat einen Molekülpeak mit der Masse 412.
Peaks mit m/e -werten von 369 (M -43) und 351 (M -43 -18) sind charakteristisch für $\Delta^{5,22}$ -Sterole (Knights ,1967).
Das Massenspektrum von Stigmasterin (Fa.Serva) stimmte völlig mit dem von Sterol 3 überein womit dieses Sterol eindeutig identifiziert ist.

Sterol 4a hat einen Molekülpeak mit der Masse 412.
Die gefundenen Peaks mit m/e -Werten von 314 (M -98) und 296 (M -98 -18) sind charakteristisch für $\Delta^{5,24(28)}$-Sterole (Knights, 1967 ; Itoh et al., 1973[b]).Die Peaks mit m/e -Werten von 386 ,396 ,284 und 267 im Spektrum von Sterol 4a -TMS bestätigen die Existenz von zwei Doppelbindungen bei $\Delta^{5,24(28)}$.
Das Fragmentierungsmuster von Sterol 4a war identisch mit den von Helmbold(1967) und Itoh et al. (1973)[b] veröffentlichten Spektren von Isofucosterin.

Das Massenspektrum von Sterol 5a ist identisch mit dem einer Aglykon eines Steinglykosids;die Aufklärung den Letzteren wird in Kapitel 2.13. behandelt (Abb.2.47.).

Tabelle 2.9.Fragmentierungsmuster der Sterole 1-,2-,3-,4-und4a-TMS-Derivaten.*

Bruchstücke	Sterol 1	Sterol 2	Sterol 3	Sterol 4	Sterol 4a
M^+	458 (2+)**	472 (2+)**	484 (2+)**	486 (2+)**	484(1+)**
M-Me	443 (1+)	457 (1+)	469 (1+)	471 (1+)	469(1+)
M-HOR***	368 (3+)	382 (3+)	394 (3+)	396 (3+)	394(1+)
M-HOR-Me	353 (1+)	367 (2+)	379 (1+)	381 (2+)	379(1+)
M-HOR-(Ring C+D+C_{18} +SK)	247 (1+)	261 (1+)	273 (1+)	275 (1+)	273(1+)
M-HOR-($C_1 \rightarrow C_3$)	329 (4+)	343 (4+)	355 (1+)	357 (4+)	355(1+)
M-SK-HOR	255 (1+)	255 (1+)	255 (2+)	255 (1+)	255(1+)
M-($C_{23} \rightarrow C_{27}$+1H)	-	-	-	-	386(5+)
M-($C_{23} \rightarrow C_{27}$+1H)-HOR	-	-	-	-	296(3+)
M-($C_{23} \rightarrow C_{27}$+1H)-HOR-Me	-	-	-	-	281(2+)
M-($C_{23} \rightarrow C_{27}$+1H)-($C_1 \rightarrow C_3$)-HOR	-	-	--	-	257(2+)

* :siehe Abb.2.47.

** :0 -20 % relativen Intensitäten (1+)
20-40 % (2+)
40-60 % (3+)
60-80 % (4+)
80-100% (5+)

*** :HOR = $HOSiMe_3$

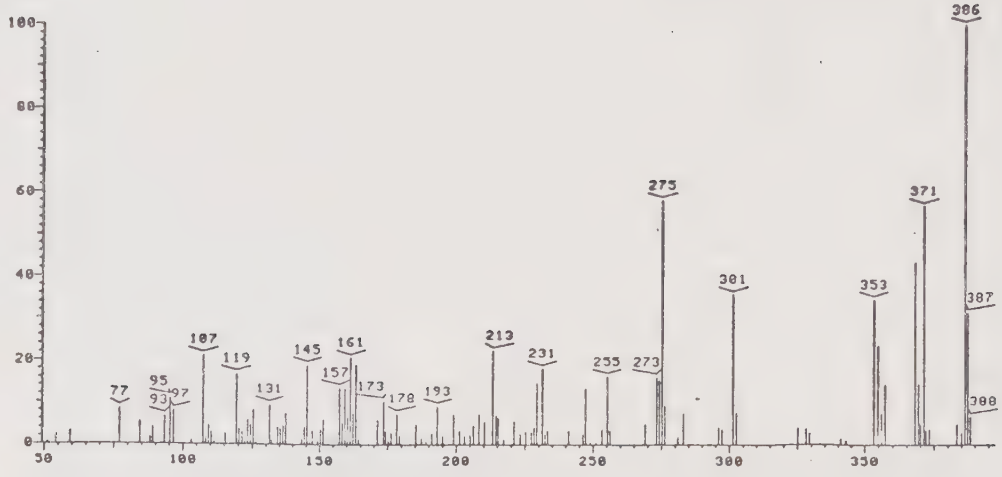


Abb.2.36.Massenspektrum von Sterol 1 ,Ionisierungenergie :80 eV.

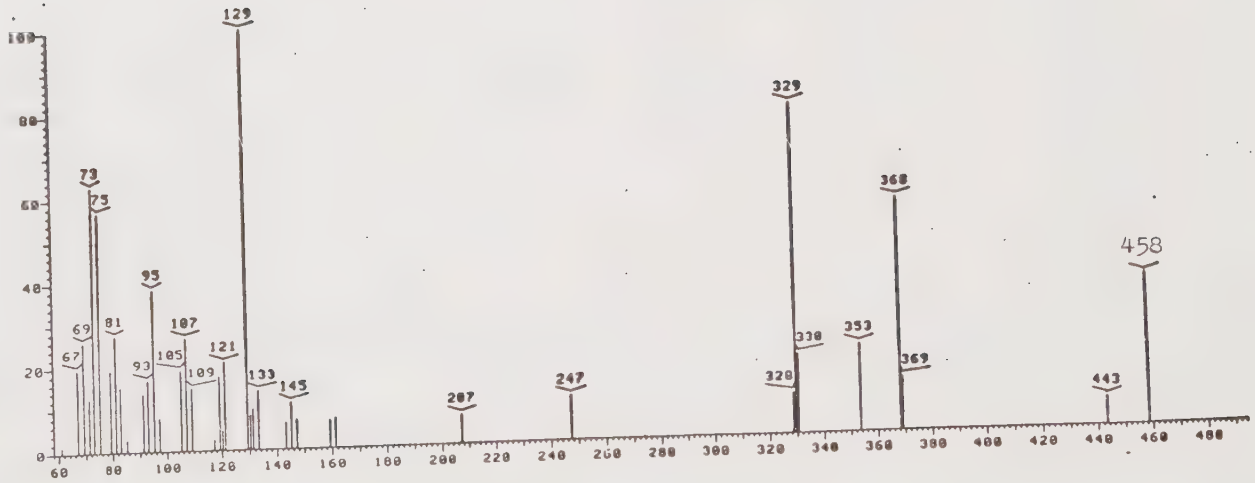


Abb.2.37. Massenspektrum des TMS-Derivates von Sterol 1, Ionisierungenergie 80 eV.

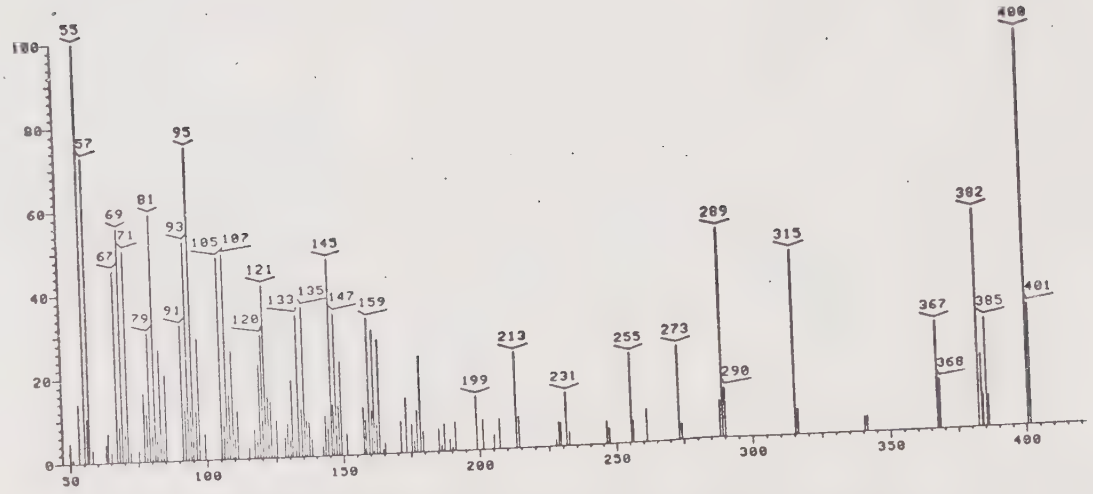


Abb.2.38. Massenspektrum von Sterol 2, Ionisierungenergie : 80 eV.

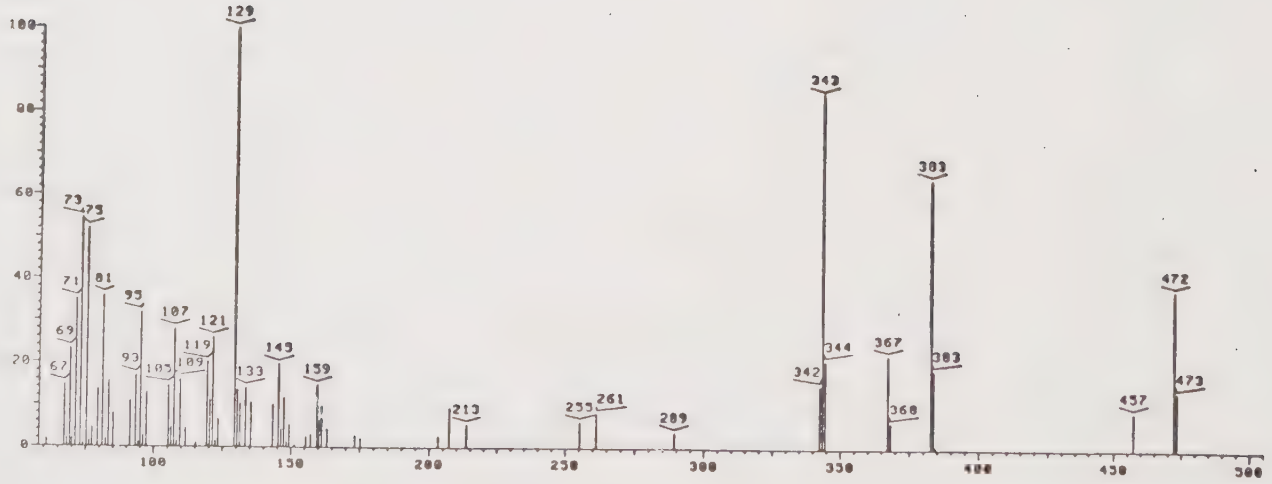


Abb. 2.39. Massenspektrum des TMS-Derivates von Sterol 2, Ionisierungenergie 80 eV.

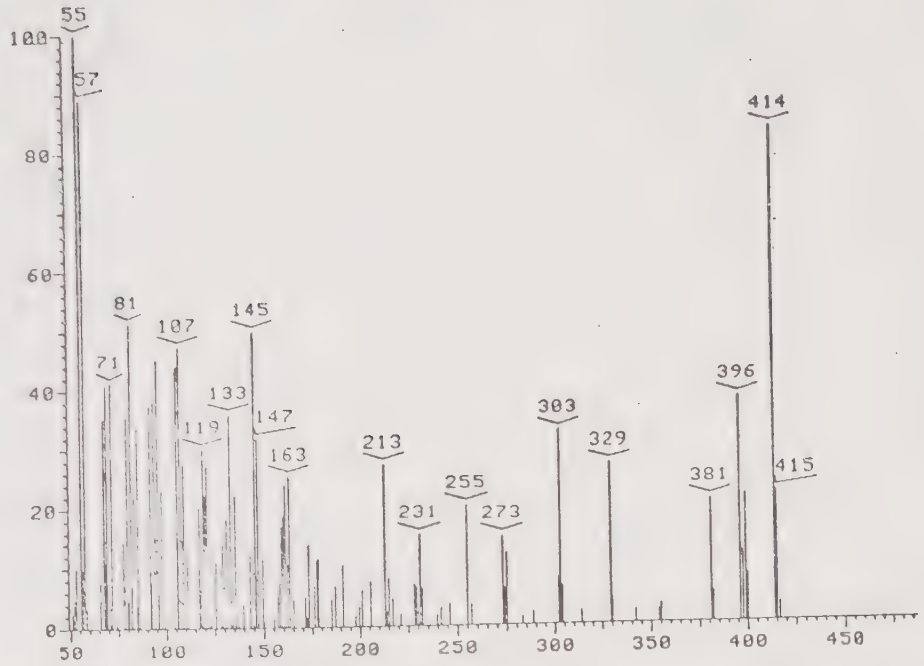


Abb.2.40.Massenspektrum von Sterol 4. Ionisierungenergie :80 eV.

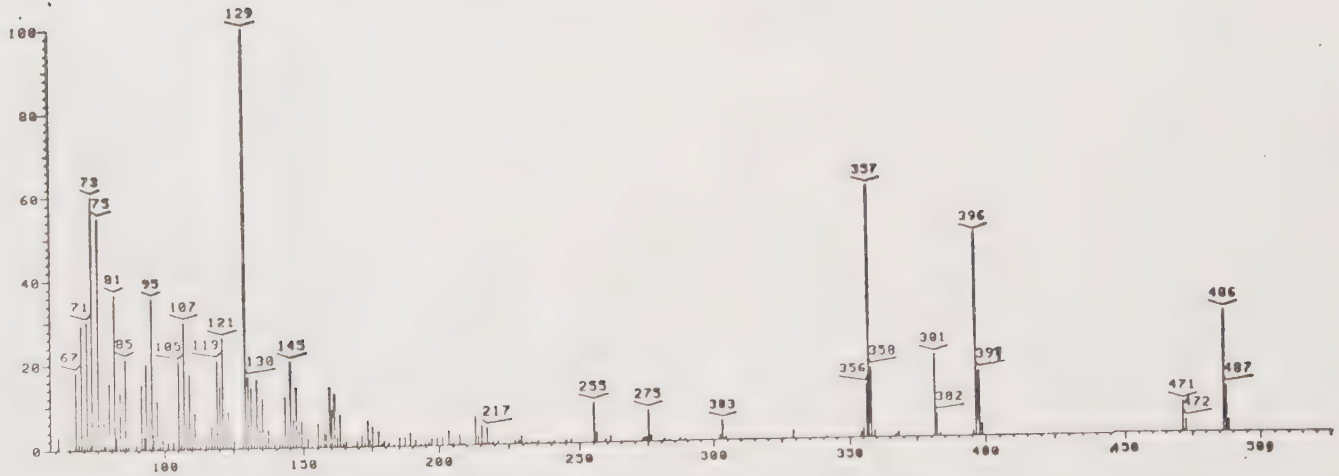


Abb.2.41. Massenspektrum des TMS-Derivates von Sterol 4, Ionisierungsenergie 80 eV.

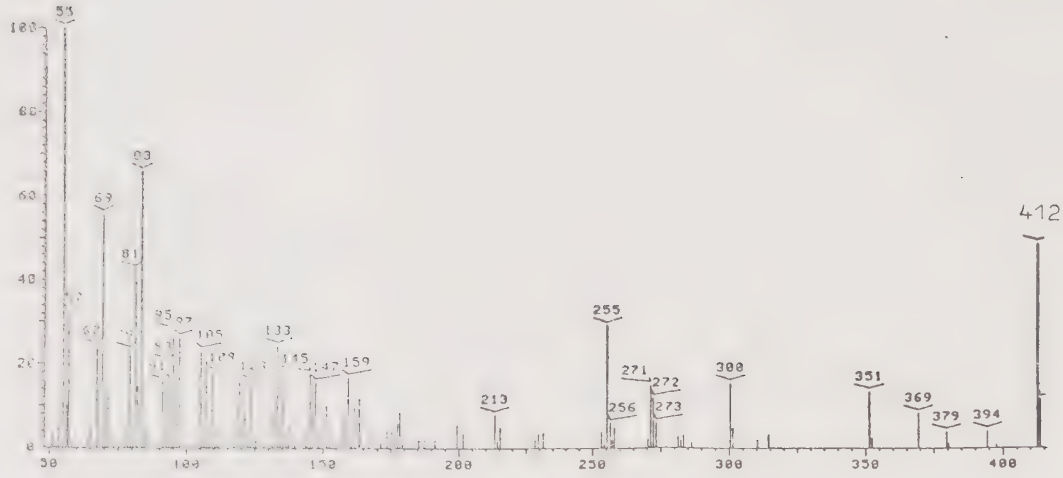


Abb. C.4.2 Massenspektrum von Sterol 3, Ionisierungenergie :80 eV.

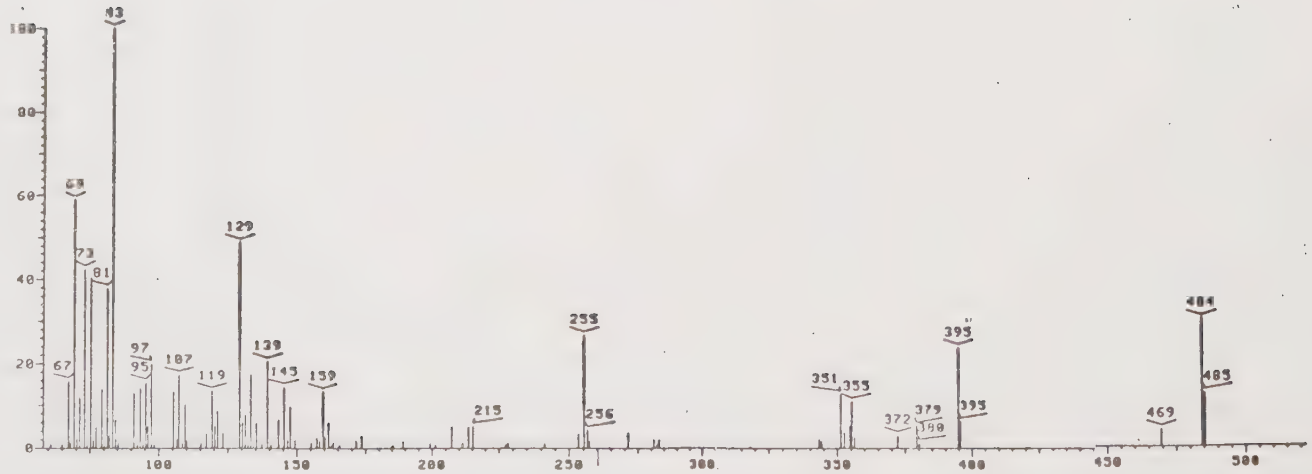


Abb.2,43. Massenspektrum TMS-Derivates von Sterol 3,
Ionisierungenergie 80 eV .

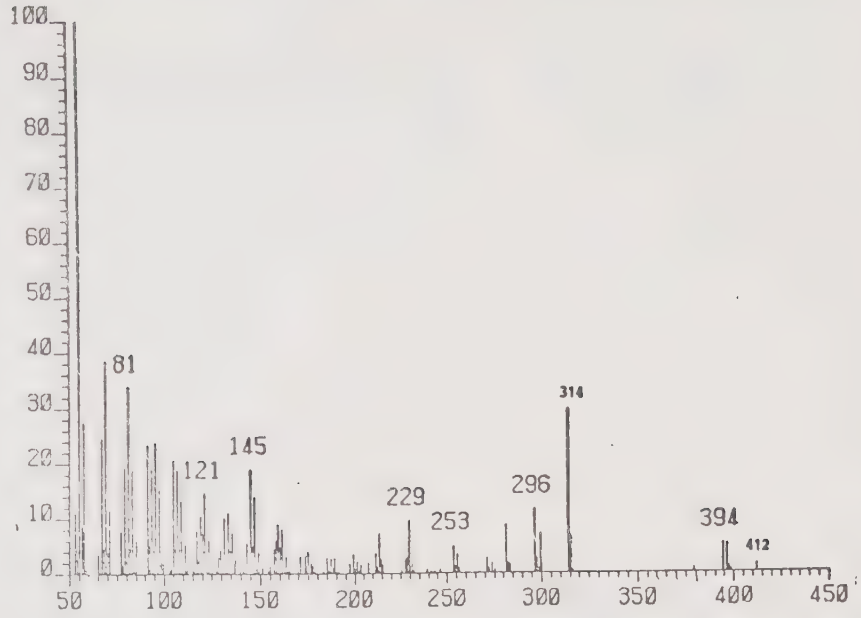


Abb.2.44.Massenspektrum von Sterol 4a ,Ionisierungenergie :80 eV.

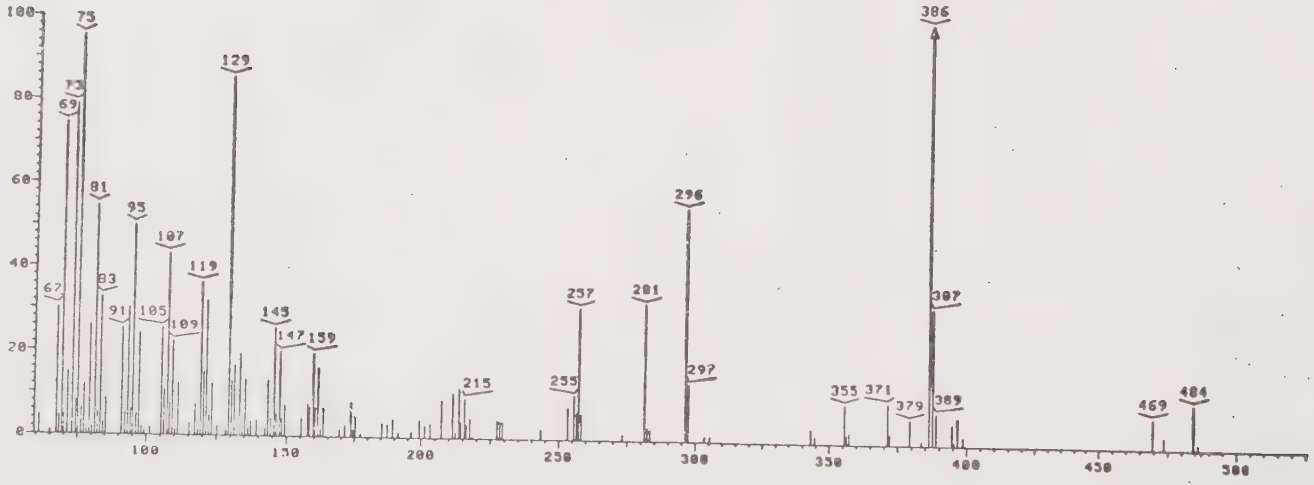


Abb. 2.45. Massenspektrum des TMS-Derivates von Sterol 4a, Ionisierungenergie 80 eV.

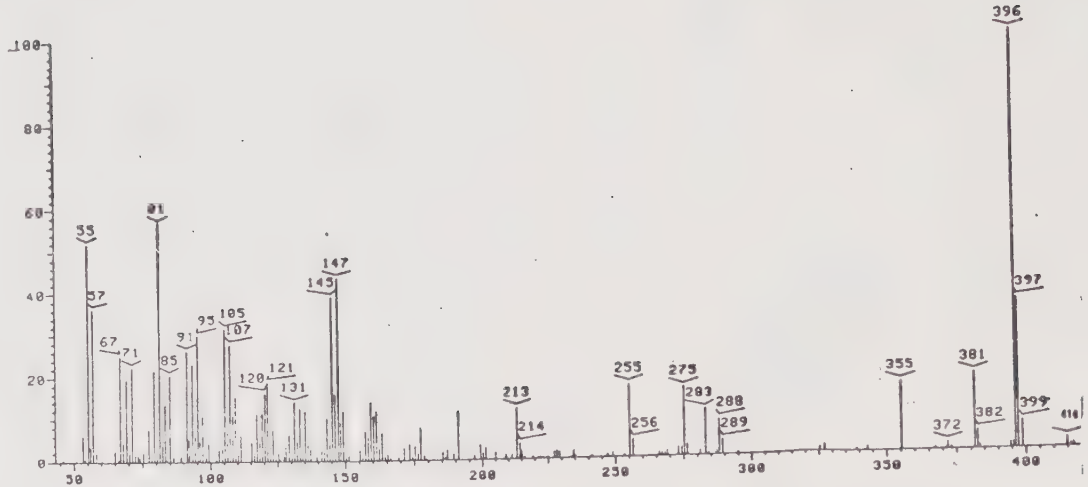
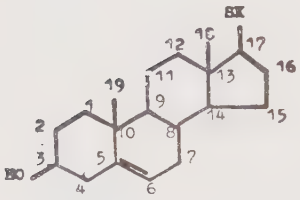
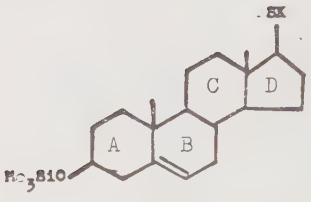


Abb.2.46. Massenspektrum von Sterol 1a ,Ionisierungenergie : 80 eV.

Abb.2.47.Formeln der Sterole 1,2,3,4 und 4a.





Trimethylsilyläther-Derivaten.

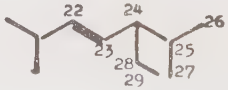
SK :

Cholesterin (Sterol 1)

Campesterin (Sterol2)

Sitosterin (Sterol 4)

Stigmasterin (Sterol 3)



Isofucosterin (Sterol 4a)

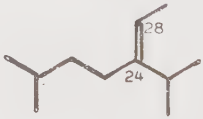


Tabelle 2.10. Zusammensetzung des Sterol -Gemisches F-3 der Kalluskulturen.

Kulturen	Sterole					
	1	1a	2	3	4	4a
S.laciniatum	++	+	+++	++	++++	+
S.wrightii	++	-	+++	+++	++++	-
C.speciosus (Stengel)	++	-	++	++++	++++	-
C.speciosus (Wurzeln)	++	-	++	++++	++++	-

0,05 -0,100 % (von TG) :++++
0,01 -0,050 % :+++
0,002-0,010 % :++
Spur :+

2.10.3. Diskussion.

Untersuchungen über die Biosynthese der Sterole in Pflanzen-Zellkulturen liegen von Benveniste et al. (1966) ,Helmbold (1977) Schmitt und Benveniste (1979), Waller et al. (1981) vor.Als primäres Cyclisierungsprodukt wurde Cycloartenol gefunden.Bekanterweise ist das primäres Cyclisierungsprodukt bei der Biosynthese der Steroide in Tieren und Pilzen Lanosterin ist (siehe Abb.1.1.).
Biesboer et al. (1982) wiesen Cycloartenol im Latex-Extrakt von Euphorbia pulcherima nach ,aber in Zellkulturen derselben Pflanzen konnte nicht gefunden werden.Diese Subtanz fehlte auch in den von Heble et al.(1976) untersuchten Zellkulturen von Holarrhena antydesenterica.
Bei den eigenen Untersuchungen konnte keine meßbaren Mengen an Cycloartenol und Lanosterin nachgewiesen werden.Es wurden aber folgende Sterole identifiziert :Cholesterin ,Campesterin , Stigmasterin ,Sitosterin ,Isofucosterin und ein unbekanntes Sterol (1a).1a fehlte in Fraktion 3 der Zellkulturen von Solanum wrightii und Costus speciosus.

Das Biosynthese-Zwischenprodukt 24-Methylencholesterin , das Heble et al (1976) in ihren Kulturen gefunden hatten ,konnte hier nicht nachgewiesen werden.
Es liegt die Vermutung nahe ,daß in Zellkulturen von Solanum laciniatum ,Solanum wrightii und Costus speciosus das primäre Cyclisierungsprodukt direkt zu Cholesterin ,Campesterin bzw. Isofucosterin umgewandelt wird.

2.11. Isolierung und Strukturaufklärung von Fraktion Fs.

Zur Isolierung von Fraktion Fs wurde die dunnschichtchromatographische Methode von Benveniste et al. (1966) angewandt, welche unter folgenden Bedingungen arbeitet :

Stationäre Phase :Kieselgel 60 F254, PSC-Fertigplatten (Shichtdicke 1mm ,Fa.Merck),
Fließmittel :Cyclohexan (6),
Detektion :Berberin-HCl ,0,1 % ,in Ethanol.

Die Fraktion , deren Rf-Wert mit dem von Squalen (Fa.Sigma) überstimmt , wurde mit Chloroform zweimal extrahiert.

Identifizierung von Fs:

1.Dunnschichtchromatographie:

Sowohl Squalen als auch Fs zeigten im Dünnschichtchromatogramm auf Kieselgel 60 F254-Fertigplatten (Schichtdicke 0,25 mm,Fa. Merck) nach Entwicklung mit den Fließmitteln (1) und (6) identische Rf-Wert von 0,90 bzw. 0,42.

2.Gaschromatographie :

Für Substanz Fs und Squalen wurden identische Retentionszeiten von 22,2 Minuten ermittelt.
Folgende Bedingungen wurden für die gaschromatographische Identifizierung angewandt :

Säule :Glas ,2 m x 2mm ,
Stationäre Phase:OV-1 3 % auf Gaschrom Q ,100-120 mesh,

Trägergas :Helium, 30 ml/min,
FID-Temperatur :300°C,
Injektortemperatur:300°C,
Temperaturprogramm:16 Minuten isotherm bei 200°C,dann Erhöhung auf 280°C, Heizrate 8°/min.

3.Gaschromatographie,gekoppelt mit Massenspektrometrie:

Als Aufnahmebedingungen wurden die unter 2.10.2.beschriebenen gewählt.Die Massenspektren von Substanz Fs und Squalen sind identisch und stimmen auch mit dem von Spiteller und Spiteller (1973) überein . Die wichtigsten Fragmentierungsbruchstücke von Subtanz Fs und Squalen sind in Tabelle 2.11.zusammengestellt. Aufgrund diesen Ergibnisse wurde Fs eindeutig als Squalen identifiziert.

Tabelle 2.11.Fragmentierungsmuster von Substanz Fs und Squalen

Bruchstücke *	m/e-Wert	rel.Int.(Fs/Squalen)
M^+	410	2/4 %
M - x	341	2/2
M - y	273	1/1
x	69	100/100
y	137	15/19
z	191	2/2
xx	327	1/1

* : siehe Abb.2.49.

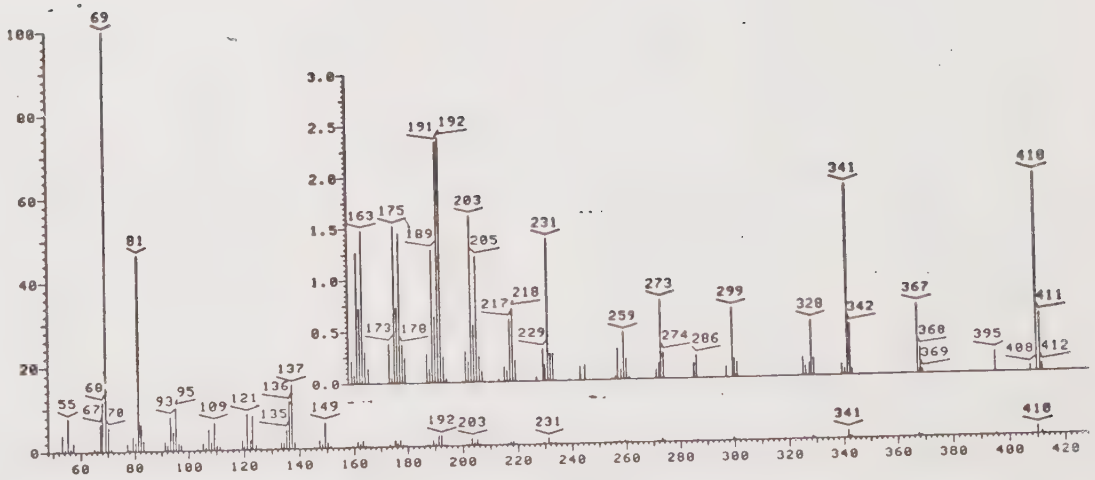


Abb.2.48.Massenspektrum von Fs , Ionisierungenergie :80 eV.

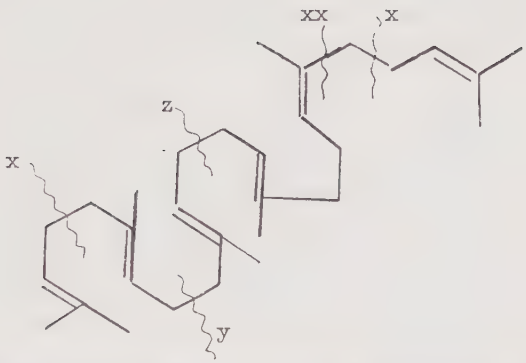


Abb.2.49.Massenspektrokopische Fragmentierungsbruchstücke von Squalen.

2.12.Isolierung Diosgenin aus Solanum laciniatum-Zellkulturen.

Der Choloroform-Extrakt (siehe 2.6.3.) wurde durch präparative Dunnschichtchromatographie unter folgenden Bedingungen isoliert:

Stationäre Phase	:Kieselgel 60,PSC-Fertigplatten (Shichtdicke 2mm ,Fa.Merck),
Fließmittel	:Fließmittel (2),
Detektion	:Anisaldehyd/H_2SO_4/CH_3COOH/Methanol (siehe 2.7.1.).

Die Bande , deren Rf-Wert mit Diosgenin (Fa.Roth) identisch, wurde zweimal mit Chloroform extrahiert.

Identifizierung von Diosgenin :

1.Dünnschichtchromatographie:

Das Diosgenin aus Zellkulturen und kaufliches Diosgenin haben nach der Trennung unter oben genannten Bedingungen identische

Rf-Werte und färben sich nach Besprühen mit dem Anisaldehyd-reagenz gelb.

2.Gaschromatographie:

Unter Verwendung der Bedingungen von Methode I (siehe 2.8.) zeigen Diosgenin aus Zellkulturen und kaufliches Diosgenin identische Retentionszeiten von 16,20 Minuten.

3.Gaschromatographie, gekoppelt mit Massenspektrometrie:

Als Aufnahmebedingungen wurden die unter 2.10.2. beschriebenen gewählt.Das Massenspektrum von Diosgenin aus Zellkulturen ist identisch mit dem von einer authentische Probe der Firma Roth. Beide Spektren stimmen auch mit dem von Budzikiewicz et al. (1962) berichteten Daten überein.

Tabelle 2.12.Fragmentierungsmuster von Diosgenin.

Bruchstücke *	m/e -Wert	rel.Int.(Diosgenin aus Zellkulturen /Diosgenin von Fa.Roth)
M^+	414	11 / 8 %
a	342	11 /11
b	300	15 /22
c	285	7 /7
b - H_2O	282	43 /43
d	271	13 /13
c - H_2O	267	9 /9
e	139	100 /100
f	115	13 /15

* : siehe Abb.2.51.

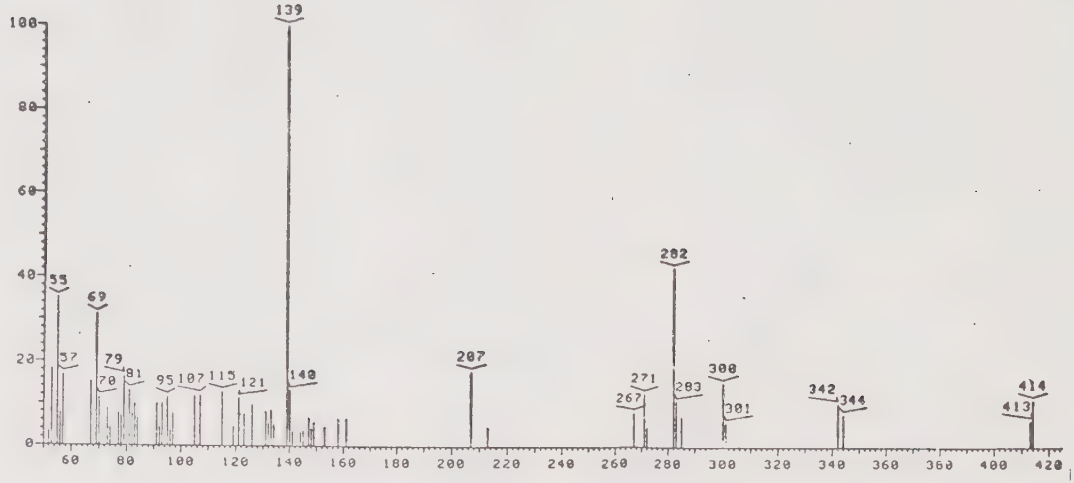


Abb.2.50.Massenspektrum von Diosgenin , Ionisierungenergie : 80 eV.

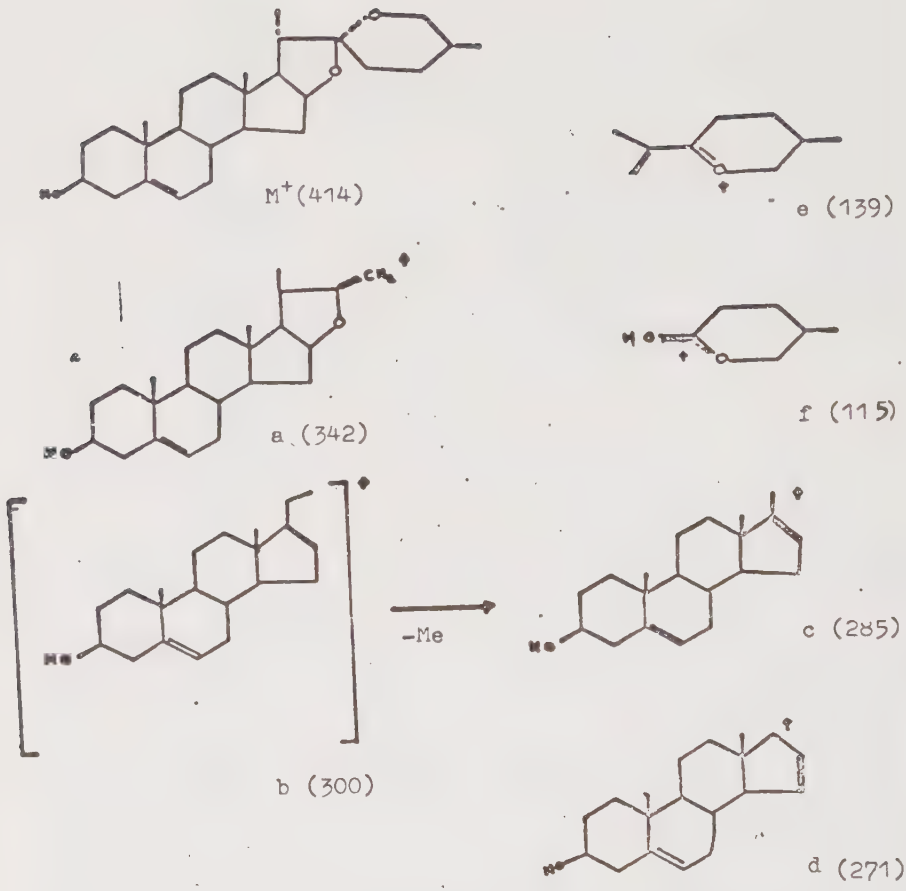


Abb. 2.51. Massenspektroskopische Fragmentierungsbruchstücke von Diosgenin.

2.13.Isolierung von X-2 (Sterin-Glykosid).

Die Fraktion X-2 (siehe 2.9.2.) wurde zur Trennung auf präparative DC-Platten aufgetragen und unter folgenden Bedingungen separiert :

Stationäre Phase	:Kieselgel 60 F254 ,PSC-Fertigplatten (Shichtdicke 1mm,Fa.Merck),
Fließmittel	:Fließmittel (3),
Detektion	:Berberin HCl 0,1 % in Ethanol.

Die Fraktion mit einem Rf-Wert 0,53 ,wurde mit Chloroform / Methanol (90 /15) zweimal unter Rückfluß extrahiert.Der Rückstand wurde mit Methanol umkristalisiert.
Es wurden aus Solanum laciniatum (50 g TG) 2,30 mg bzw. 2 mg aus Solanum wrightii (50 g TG) Steringlykosid gewonnen.

2.13.1.Hydrolyse von X-2 mit 2N methanolischer Salzsäure.

1 mg des isolierten Steringlykosids wurden 2 Stunden lang in 10 ml 2 N methanolischer HCL am Rückfluß erhitzt.Das Hydrolysat wurde mit Wasser auf das fünffache Volumen verdünnt.
Die Stecine wurden aus dem Hydrolysat durch dreimaliges Ausschütteln mit je 20 ml Chloroform gewonnen.

2.13.2. Hydrolyse von X-2 mit 2N Trifluoressigsäure.

0,5 mg des isolierten Steringlykosids wurde mit 5 ml 2 N Trifluoressigsäure versetzt und im Trockenschrank 8 Stunden lang bei 90°C gehalten.
Das Hydrolysat wurde zur Trockne eingeengt, der Rückstand zwei- bis dreimal mit wenig Wasser versetzt und wieder eingeeengt ,um die überschüssige Trifluoressigsäure zu entfernen.

2.13.3. Identifizierung der Komponenten des Glykosid-Gemisches.

2.13.3.1. Aglyka.

Die Sterinen wurden gaschromatograpisch (siehe 2.8.) unt mit Hilfe der GC -MS (siehe 2.10.2.) identifiziert.

2.13.3.2. Zucker -Fraktion.

1.Dünnschichtchromatographie :

Für die Dünnschichtchromatographie werden folgende Bedingungen gewählt (nach Randerath ,1965):

Stationäre Phase :0,02 M Na Acetat impragnierte Kieselgel 60 F254- Fertigplatten (Schichtdicke 0,25mm, Fa.Merck),

Fließmittel :n-Butanol/Essigsäure/Ether/Wasser (9 /6 /3 /1),

Detektion :0,5 ml Anisaldehyd + 0,5 ml H_2SO_4 + 9 ml Ethanol 96 %.

Die Rf-Werte betrugen für Glucose 0,23 (hellblau), für Fructose 0,53 (violett).

2.Identifizierung mit Hilfe eines Zuckeranalysators.

Zur Analyse wird die Ionenaustausch-Chromatographie -Methode nach Bauer und Voelter (1976) angewandt.

2.13.4. Ergebnis und Diskussion.

Die GC-Untersuchungen (Abb.2.52 und 2.53) zeigten , daß das Aglyka-Muster der beiden isolierten Steringlykosid-Gemische identisch ist. Die GC -MS-Untersuchungen bestätigten daß es sich bei den Peaks 2,3 und 4 um Campesterin ,Stigmasterin und Sitosterin handelt.
Peak 1a hatte das gleiche Fragmentierungsmuster wie Sterol 1a (siehe 2.10.2.).Dieses besaß einen Molekülpeak mit der Masse 414. Im Massenspektrum von 1a traten weitere Signale bei m/e-Werten von 399 ,396 ,381 ,355 ,275 ,255 und 213 auf.

Dieses Muster ähnelt dem jenigen von Sitosterin (vgl.Abb. 2.40. und 2.46.). Es fehlen jedoch die für Δ^5-Sterole chrakteristischen Peaks mit m/e-Werten von 303 und 329 ; dies bedeutet, daß das Subtanz 1a kein Δ^5-Sterol ist.Im Spektrum der unbekannten Subtanz fällt der intensive Peak von M-18 (100%)auf. Die geringen Mengen von Subtanz 1a reichten jedoch für eine weitere Isolierung und Untersuchung nicht aus. Durch Vergleich der Peakflächen der Gaschromatogramm konnte der prozentuale Anteil der einzelnen Sterole (Aglykon) am Gesamtaglykongehalt der Steringlykosid ermitellt werden.

Tabelle 2.13. Mengenmaßiger Anteil der verschiedenen Aglyka vom Steringlykosid-Gemisch.

Zellkulturen	"Sterol 1a"	Campesterin	Stigmasterin	Sitoster.
S.laciniatum	25%	8%	Spur	66%
S.wrightii	40%	Spur	Spur	60%

Nach einer Hydrolyse der Steringlykoside mit Trifluoressigsäure wurden die Zucker dünnschichtchromatograpisch sowie durch Ionenaustausch-Chromatographie als Glucose und Fructose (Solanum laciniatum) bzw, Glucose (Solanum wrightii) identifiziert.

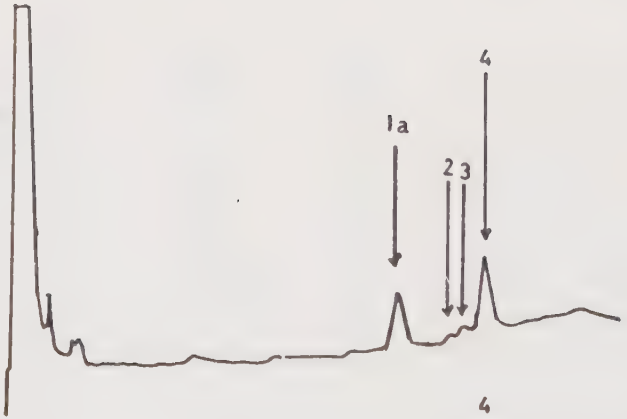


Abb.2.52. Gaschromatogramm der Aglyka des Steringlykosid-Gemisches aus Solanum wrightii.

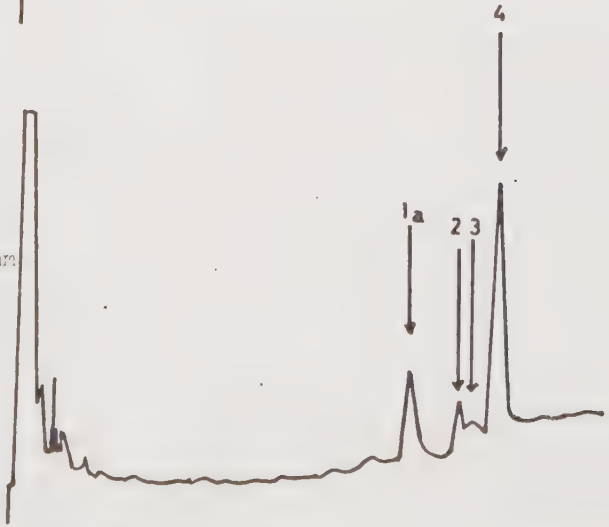


Abb.2.53. Gaschromatogramm der Aglyka des Steringlykosid-Gemisches aus Solanum laciniatum.

2.14. Quantitative Bestimmung der Steroidgehalt in Zellkulturen.

Um die Steroidgehalte in den Zellkulturen zu bestimmen, wurde die gleiche Gaschromatographie-Methode (I) wie unter 2.8. beschriebenen verwendet.
Als interner Standard wurden 5α-Preganan,3,20-dion (für freie Sterole) und Hecogenin (für Diosgenin /Solasodin) verwendet.Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Integrators vom Typ 3390A-Hewlett-Packard.
Die Durchschnittswerte der Steroidgehalte sind in Tabelle 2.1-. zusammengefaßt.

Diskussion.

Diese Untersuchungen zeigen ,daß das Hauptsteroid in den beid- Solanum- Zellkulturen Sitosterin ist. Die Sitosteringehalte liegen zwischen 0,50 -1,11 mg/g TG .Solasodin, der Hauptinhaltstoff in den meisten Solanumarten, konnte in Zellkulturen nicht nachgewiesen werden.Der Austausch von NAA gegen 2,4-D als Wuchstoff (Medium G75N--------> Medium G75D) konnte die Solasodinbiosynthese auch nicht stimulieren.Dagegen konnten Heble et al. (1971) Spuren von Solasodin in ihren Zellkulturen identifizierten.Zugabe von 1g/l Casein verbesserte das Ergebnis ebensowenig. Diosgenin wurde in Zellkulturen von Solanum laciniatum nur dann identifiziert, wenn diese in den Medien G 75N/G 75NC und G 75D/ G 75 DC gehalten wurden.Auch im einer Suspensionskulturen von Solanum laciniatum, die 46 Passagen in Dunkeln kultiviert wurden, konnte praktisch ein unveränderter Diosgeninhalt nachgewiesen werden.Dies bedeutet ,daß die Disgenin-Biosynthese in Gegensatz zu Solanidin (Steroidalkaloid) nicht an das Vorhandensein von Chlorophyl gebunden ist (vgl. Ramaswamy et al.,1976).Die Überführung der Kultur in ein saccharosefreies MS-Medium (Medium G 75 NoS) bewirkte keine signifikante Steigerung des Diosgeningehaltes,wie sie von Heble und Staba (1980) für Zellkulturen von Dioscorea deltoidea gefunde wurden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen von Costus-Zellkulturen zeigten,daß Sitosterin und Stigmasterin die Hauptsteroid-inhaltsstoffe sind. Diosgenin konnte nicht gefunden werden. Dagegen berichteten Rathore und Khanna (1979),daß in ihren Costus-Zellkulturen Diosgenin ,Tigogenin ,Lanosterin und Stigmasterin gebildet worden waren.

Tabelle 2.14. Steroidgehalte in Zellkulturen (mg /g TG).

Kultur	Medium	Alter	Typ	Sol.	Dios.	Cho.	Camp.	Stig.	Sito.
SL	G-75N	30 Tage	K	-	0,25	Spur	0,15	Spur	1,00
SL	G-75N	7	S	-	0,20	Spur	0,25	Spur	1,00
SL	G-75NC	7	S	-	0,20	0,15	0,25	Spur	1,10
SL	G-75I	7	S	-	-	0,15	0,25	Spur	0,90
SL	G-75IC	7	S	-	-	0,12	0,15	Spur	0,80
SL	G-75D	7	S	-	0,10	0,04	0,25	Spur	0,50
SL	G-75DC	7	S	-	0,10	Spur	0,30	Spur	0,50
SL	G-75D	30	K	-	0,20	Spur	0,15	Spur	0,90
SW	G-75N	30	K	-	-	Spur	0,10	0,10	0,70
SW	G-75N	7	S	-	-	Spur	0,10	0,10	0,60
CS	G-48	30	K	-	-	Spur	Spur	0,50	0,60
CS	G-48	14	S	-	-	Spur	Spur	0,60	0,70
CW	G-48	30	K	-	-	Spur	Spur	0,50	0,70
CW	G-48	14	S	-	-	Spur	Spur	0,60	0,80
SL	G-75NoS	14	S	-	0,20	Spur	0,17	Spur	0,73
SL'D	G-75N	7	S	-	0,15	0,10	0,15	Spur	1,11

SL =S.laciniatum ;SW =Solanum wrightii ;CS =C.speciosus (Stengel) ;CW =C.speciosus (Wurzel)
SL'D = SL ,die in Dauer dunkel kultivieren.
Typ : S = Suspensionskulturen ;K = Kalluskulturen
Sol.=Solasodin;Dios.=Diosgenin ;Cho.=Cholesterin;Camp.=Campesterin;Stig.=Stigmasterin ;
Sito.=Sitosterin

2.15.Fermenterkulturen.

2.15.1.Fermentervorkulturen.

Die Vorzucht für die Fermentation wurde in 1l - Erlenmeyer-Kolben mit 300 ml Nährlösung unter den gleichen Bedingungen wie 2.4.1. kultiviert.
Der Versuche wurden mit den Zellkulturen von Solanum wrightii (28.Passage) durchgefuhrt.Das Inokulum bestand aus 10 Kolben einer 7 Tage alten Vorzucht.

2.15.2.Fermentation.

Die Fermentation wurden in einem 20 l-"Airlift"-Fermenter nach Wahl (1977) durchgefuhrt.Die Fermentation erfolgte bei Zimmertemperatur und einer Belüftung von 200 Liter Luft pro Stunden.

2.15.3.Analytik.

2.15.3.1.Bestimmung der Restglucose in der Nährlösung.

Die Restglucosemengen wurden enzymatisch mit Hilfe eines Glucose-Analysators der Fa.Beckman Instrument(Fullerton,USA) ermitellt.

2.15.3.2.Qualitative und quantitative Bestimmung der freien Sterole und Triterpene in der Gewebefraktion.

Die qualitative und quantitative Untersuchung wurde mit Hilfe der Gaschromatographie wie 2.8. und 2.14. durchgefuhrt.
Die Sterole-Konzentration wurde auf Sitosterin bezogen und in mg/ l Nährlösung angegeben.
wegen des Mangels an Triterpene-Referenzsubstanzen(Lupeol,Betulin, Betulinaldehyd,Betulinsäure) konnten hier nicht die Absuluten Mengen an Triterpene ermitellt werden.Statt dessen wurde Sitosterin für die Triterpene in der Extrakte als Berechnungsstandard verwendet. Die so erhaltenen Werte (mg/l) wurden mit

10^{-1} multipliziert und in der Abb.2.54.als relative Mengen an Triterpene pro Liter Medium berechnet.

2.15.4.Ergebnis und Diskussion.

Die GC -Profile der Fermenterkulturen der Petrolether-extrakte wurden in der folgenden Tabelle 2.15. dargestellt.

Tabelle 2.15. GC-Profile der Petolätherextrakte.

Tage	Cho.	Camp.	Stig.	Sito.	Lup.	Bet.ald.	Bet.
4	Spur	Spur	Spur	+	-	-	-
6	Spur	Spur	Spur	+	-	-	-
8	Spur	Spur	Spur	+	+	+	+
14	Spur	Spur	Spur	+	+	+	+
18	Spur	Spur	Spur	+	+	+	+
21	Spur	Spur	Spur	+	+	+	+

Cho.=Cholesterin ;Camp.=Campesterin ;Stig.=Stigmasterin ; Sito.= Sitosterin ; Lup. = Lupeol ;Bet.ald.=Betulinaldehyd; Bet. =Betulin.

Die GC-Untersuchungen der Petrolether-Extrakte zeigten daß das Hauptsterol in der Fermenterkultur Sitosterin ist.Andere Sterole wie Cholesterin ,Campesterin und Stigmasterin konnten nur in Spuren identifiziert werden.Der Sitosteringehalt lag zwischen 0,17 -0,43 mg / g TG (= 0,136 -1,29 mg / l). Am 8.Tag konnten nur 0,22 mg /g TG (0,43 mg / l) Sitosterin gefunden werden dies bedeutet nur ca. 1/3 des Sitosteringehaltes in einer 7 Tage alten Suspensionskultur.
Die Triterpene Lupeol ,Betulinaldehyd und Betulin konnten erst vom 8.Tag im Fermenter gefunden werden.Durch Vergleich der Peakflächen von Triterpene und Sitosterin konnten relative

Mengen von Triterpene berechnet werden; diese stiegen von 0,7 am 8.Tag auf 82,1 am 21.Tag; dies bedeutet eine 117fach Steigerung. Die Menge an Sterolen dagegen hatte im gleichen Zeitraum nur etwa dreifach zugenommen.

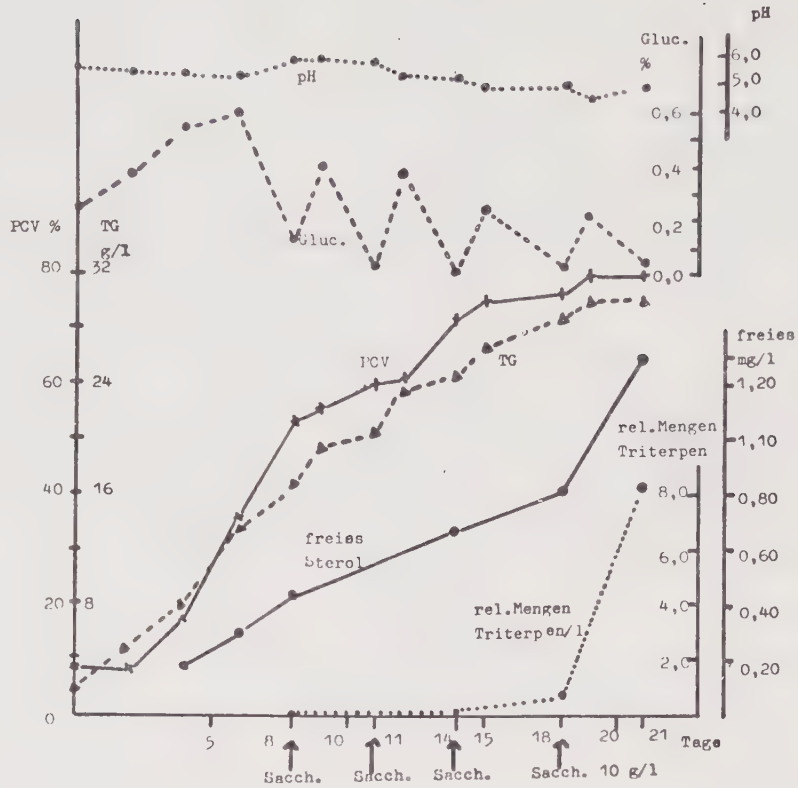


Abb.2.54.
Fermentationversuch mit Solanum wrightii (Medium G-75N).

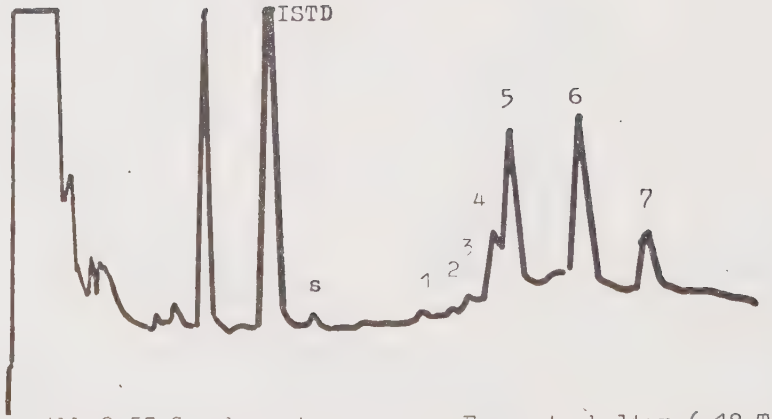


Abb.2.55.Gaschromatogramm aus Fermenterkultur (18.Tag) von Solanum wrightii.
s= Squalen; 1 =Cholesterin ; 2 =Campesterin ; 3=Stigmasterin ; 4= Sitosterin ; 5= Lupeol ; 6=Betulinaldehyd ; 7=Betulin ;ISTD=Interner Standard.

3.Zusammenfassung.

Die angeführten Untersuchungen zeigen,daß die beschriebenen Zellkulturen in der Lage sind, die folgende Steroide und Triterpene zu synthetisieren:

Zellkulturen	Vorstufe	Steroide	Triterpene
S.laciniatum	Squalen	Cholesterin, Campesterin, Stigmasterin, Sitosterin, Isofucosterin, Diosgenin.	Lupeol, Betulin, Betulinaldehyd, Betulinsäure.
S.wrightii	Squalen	Cholesterin, Campesterin, Stigmasterin, Sitosterin.	Lupeol, Betulin, Betulinaldehyd, Betulinsäure.
C.speciosus	Squalen	Cholesterin, Campesterin, Stigmasterin, Sitosterin.	--------

Solasodin bzw.Diosgenin, die Hauptinhaltsstoffe in den meisten Solanumarten bzw. in Costus speciosus, konnten in diesen Zellkulturen nicht nachgewiesen werden.
Die Inhaltstoffsmuster der beiden Solanum -Zellkulturen sind sehr ähnlich; dies deutet darauf hin ,daß die Biosyntheseweg der Steroide und Triterpene in diesen Zellkulturen fast identisch sind.

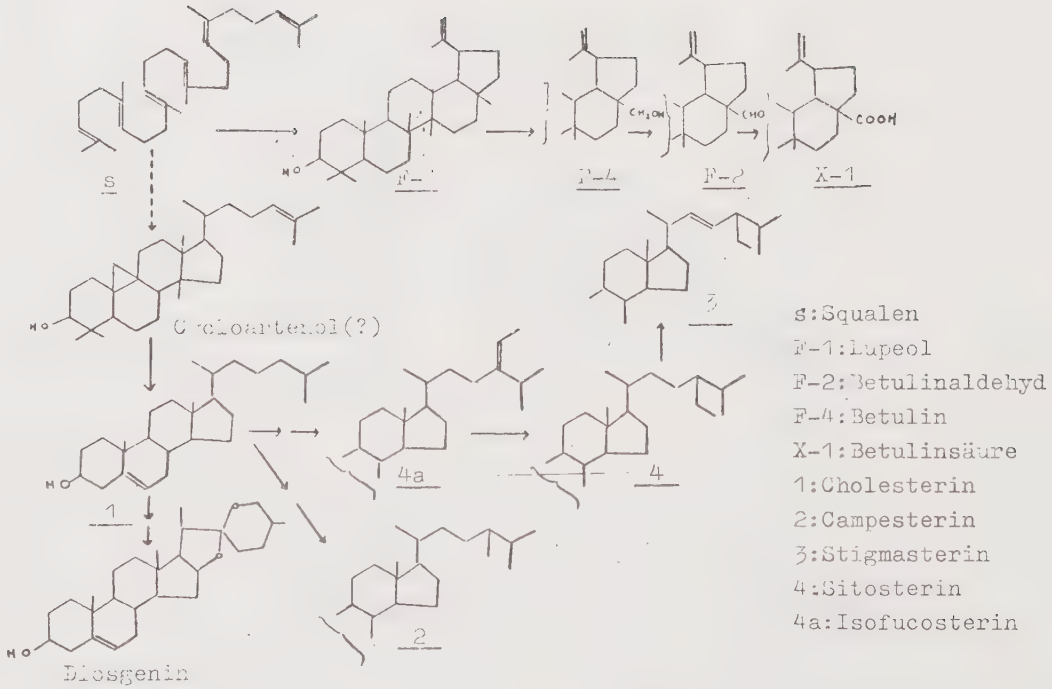


Abb.3.1. Ein möglicher Biosyntheseweg der Stercide und Triterpene in Zellkulturen von Solanum lucinatum.

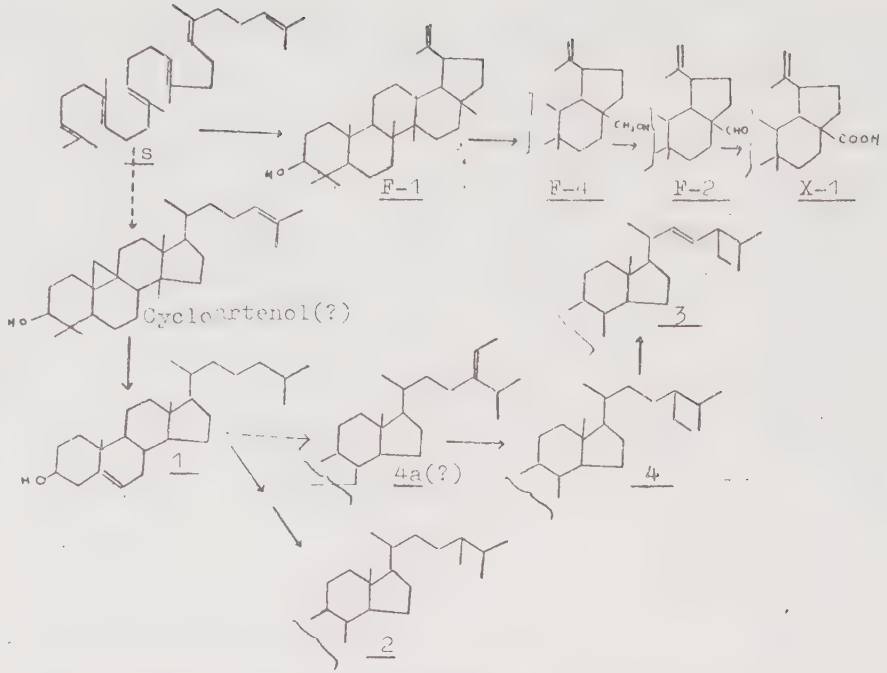


Abb.3.2.Ein möglicher Biosyntheseweg der Steroide und Triterpene in Zellkulturen von Solanum wrightii.

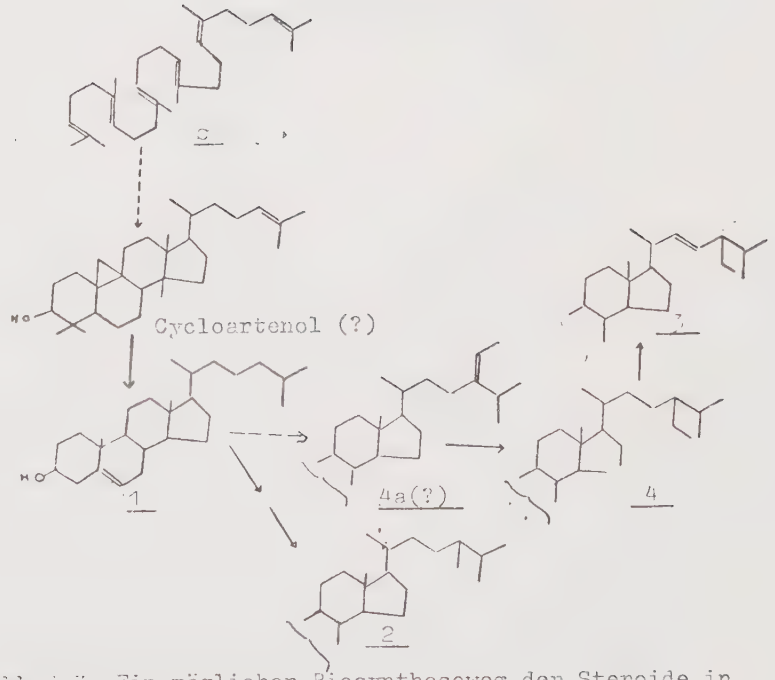


Abb. 3.3. Ein möglicher Biosyntheseweg der Steroide in Zellkulturen von Costus speciosus.

Veränderungen der Mediumzusammensetzung hatten nur geringen Einfluß auf das Inhaltstoffsmuster der Zellkulturen von Solanum laciniatum.
Außer den freien Sterolen , die identifiziert werden konnten, wurden auch als Steringlykoside gebundene Sterole aus den Zellkulturen beider Solanumarten isoliert, wobei die Sterin-Glykosid-Fraktionen das gleiche Aglyka-Muster aufweisen.
Die Fermenterkultur von Solanum wrightii hat das gleiche Inhaltstoffsmuster wie die Kallus - und Suspensionskulturen, aber im gleichen Zeitraum produziert die erstere weniger Stero- .

4.Literaturverzeichnis.

1. Adam,G., Huong,H.Th., Khoi,N.H., Theconstituent of the Vietnamese Plant Drug Solanum verbascifolium L., Intern.Meeting on Medicinal Plant Research,Budapest,1979.

2. Ahmad,V.U., in Vorber. (1982).

3. Bauer,H., Voelter,W., Chromatographia 9,433-438 (1976).

4. Benveniste,P., Hirth,L., Currison,G., Phytochemistry 5,31-44 (1966).

5. Benveniste,P., Hirth,L., Currison,G., Phytochemistry 5,45-58 (1966)

6. Bhattacharyya,J., Korrol,U., Nites,D.H., Phytochemistry 15, 431 -433 (1976).

7. Biesboer,D.D., D'Amour,F., Wilson,R.E., Mahlberg ,P., Phytochemistry 21,1115 -1118 (1982).

8. Breitmaier,E., Voelter,W., ^{13}C-NMR-Spectroscopy,Methods and applications in Organic Chemistry,Verl.Chemie,Weinheim, New York (1978).

9. Brooks,C.J.W., Biochem.et Biophysic.Acta 296,431-445 (1973).

10. Budzikiewicz, H., Wilson,J., Djerassi,C., Monats.Chemie 93, 1033-1041 (1962).

11. Budzikiewicz ,H., Wilson,J.M., Djerassi,C., J.Am.Chem.Soc.85, 3688 -3699 (1963).

12. Budzikiewicz ,H., Djerassi,C., Williams,D.H., Structure elucidatic of Natural Products by MS,Vol II,Holden Day (1964).

13. Carle,R., Diss.Tübingen (1979).

14. Carle,R., Reinhard,E., Planta Medica 39,381 -382 (1979).

15. Clayton,R.B., Quarterly Reviews 19,189 (1965).

16. Creswell,J.C., Runquist,O.A., Campbell,M.M., Spectral Analysis of Organic Compounds,Longman (1972).

17. Dawidar,A.M.,Saleh,A.A.,Elmotei,S.E.,Planta Medica 24, 367 -370 (1973).

18. Europäisches Arzneibuch, Band I, Band II, Komentar, Wissenschatliche Verlagsgesellschaft MBH Stuttgart,Govi-Verlag GMBH Frankfurt (1976).

19. Gleispach,H.J., J. Chrom. 93 ,407 -412 (1974).

20. Grunwald, C., Steroids, in :Secondary Plant Products, Herausgegeben von Bell,E.A.,Charlwood,B.V.,Springer,Verlag, Berlin,Heidelberg,New York (1980).

21. Gupta,M.M.,Farooqui,S.V.,Lal,R.N.,J. Nat. Products 44, 486 -489 (1981).

22. Heble,M.R.,Narayanaswami,S.,Chada,M.S., Phytochemistry 10, 910 (1971)[a].

23. Heble,M.R.,Narayanaswami,S.,Chada,M.S., Phytochemistry 10, 2393 -2394 (1971)[b].

24. Heble,M.R.,Narayanaswami,S.,Chada,M.S., Phytochemistry 15, 681 -682 (1976).

25. Heble,M.R., Staba,E.J.,Planta Medica Supp.40,120-123 (1980)[b].

26. Heble,M.R.,Staba,E.J., Planta Medica Supp.40,124-128 (1980)[b].

27. Heftmann,E.,Chromatography of Steroids,Elsevier Scientific Publ.Company (1976).

28. Heftmann, E.,Steroid Biochemistry,Academic Press,New York (1970).

29. Hegnauer,R.,Chemotaxonomie der Pflanzen,Band 3,Birkhäuser Verlag Basel Stuttgart (1964).

30. Hegnauer,R.,----------Band 4, (1966).

31. Hegnauer, R.,----------Band 5, (1969).

32. Hegnauer,R.,----------Band 6, (1973).

33. Heintz,R.,Benveniste,P., J.Biol.Chem.12 ,4267 -4274 (1970).

34 Helmbold,H,, Diss.Tübingen (1977).

35. Hunter, I.R., Walden, M.K., Wagner, J.R., Heftman, E., J. Chrom. 118, 259 -262 (1976).

36. Indrayanto, G., Soewandi, T.B., Soebahagiono., Sundrawati, E., Sutarjadi., The Solasodine Content of Solanum grandiflorum, Unesco Regional Seminar on Medicinal Plant, Bangkok, 1979.

37. Itoh, T., Tamura, T., Matsumuto, T., Lipids 9, 173 -184 (1973).[a]

38. Itoh, T., Tamura, T., Matsumuto, T., JAOCS 50, 122 -125 (1973).[b]

39. Jain, N., Rathore, A.K., Jain, S.C., J. Nat. Products 44, 125-126 (1981).

40. Jain, S.C., Samoo, S., Chem. Pharm. bull. 29, 1765-1769 (1981).

41. Khanna, P., Uddin, A., Charra, G.B., Manot, S.K., Rathore, A.K., Indian J. Exptl. Biol. 14, 694 -696 (1976).

42. Knights, B.A., J. Gas Chrom. 273 -282 (1967).

43. Knights, B.A., Qualitative and quantitative Analysis of Plant Sterol by GC., in: Modern Method of Steroid Analysis, Herausgegeben von Heftmann, E., Academic Press (1973).

44. Koblitz, H., Zell und Gewebezüchtung bei Pflanzen, G. Fischer Verlag, Stuttgart (1972).

45. Kösten, S., Willuhn, G., Planta Medica 24, 278 -285 (1973).

46. Lehn, M.J., Currison, G., Bull. Soc. Chim. Fr. 1137-1142 (1962).

47. Muraschige, T., Skoog, F., Physiol. Plant. 15, 473 (1962).

48. Nickell, L.G., Products, in: Plant Tissue Culture as a source of Biochemicals, Herausgegeben von Staba, E.J., CRC Press Inc., Boca Raton Florida (1980).

49. Organikum, Organisch -Chemisches Grundpraktikum, VEB Deutcher Verlag der Wissenschaften, Berlin (1970).

50. Overton, A.H., Ricken, B.J., Studies in Secondary Metabolism with Plant Tissue Culture, in: Progress in the Chemistry of Organic Natural Pruducts, Herausgegeben von Hez, W. eta al., Wien, Springer Verlag, New York (1977).

51. Pakrashi, S.C., Bhattacharyya, J., Mookerjee, S., Vorgbrüggen, H., Phytochemistry 7, 461 -468 (1968).

52.Randerath,K.,Dünnschichtchromatographie,Verlag Chemie GMBH,Weinheim/bergstr. (1965).

53.Ramaswamy,N., Eur.J. Biochem. 67 ,275 (1976).

54.Rathore,A.K.,Khanna,P.,Planta Medica 35,289 -290 (1979).

55.Roddick,J.G., Isoprenoid Alkaloid, in :Secondary Plant Products, Herausgegeben von Bell,E.A.,Charlwood,B.V.,Springer Verlag Berlin ,Heidelberg,New York (1980).

56.Schmitt,P.,Benveniste,P.,Phytochemistry 18,1659-16665(1979).

57.Schmitt,P.,Benveniste,P.,Phytochemistry,18,445-450 (1979).

58.Shamma,M.,Glick,K.,Humma,R.O., J.Org.Chem 27,4512-4517 (1962).

59.Sholichin,M.,Yamasaki,K.,Kasai,R.,Tanaka,O.,Chem.Pharm.Bull. 28,1006-1008 (1980).

60.Singh,H.,Kapoor,V.K.,Manhas,M.S.,Planta Medica 28,392-396(1975)

61.Spiteller,M.,Spiteller,G.,Massenspektrumsammlung,Springer-Verlag,Wien,New York (1973).

62.Staba,E.J.,Secondary Metabolism and Biotransformation, in :Tissue Culture as a source of Biochemicals,Herausgegeben von Staba,E.J.,CRC Press Inc.Boca Raton Florida (1980).

63.Stahl,E.,Dünnschichtchromatographie,Ein Laboratoriumshandbuch, Springer Verlag Berlin Göttingen Heidelberg (1962).

64.Supniewska,J.H.,Dhonnal,B., Diss.Phar.Pharmacol. 24,187(1972).

65.Vagujfalvi,D.,Maroti,M.,Tetenyl,P.,Phytochemistry 10, 1389 (1971).

66.Velluz,L., Optical Circular Dichroism, Academic Press INc. New York London (1965).

67.Wahl,J., Diss.Tübingen (1977).

68.Waller,G.R.,Mangiafico,S.,Foster,R.C.,Lawrence Jr.,K.H., Planta Medica 42,344-355 (1981).

69.Wenkert,E.,Baddeley,G.V.,Burfit,I.R.,Moreno,L.N., Organic Magnetic Resonanz 11,337-343 (1978).

70. Willuhn, G., Pharmazeutische Zeitung 121, 1491-1501 (1976).

71. Willuhn, G., May, S., Herfort, I., Planta Medica 46, 99-104 (1982).

Lebenslauf

1949	am 27.März in Kediri als Sohn von Sulindra und Ratnawati Tarunadjaja geboren
1955 -1961	Grundschule in Kediri
1961 -1967	SMP -SMA (Gymnasium) in Kediri am 25.November 1967 Reifeprüfung
1968 -1974	Studium der Pharmazie an der Airlangga-Universität in Surabaya,am 28.Februar Drs - Prüfung
1975	am 5.Juni Approbation als Apotheker
1975 -1980	Wissenschaftlicher Angestellter an der Airlangga -Universität, Dept. of Pharmacognosy
Okt.1980 - Sept.1981	DAAD-Stipendiat bei Herrn Prof.Dr.E.Reinhard am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Tübingen
Okt.1981 - Apr.1983	am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie als wissenschaftliche Hilfskraft angestellt
Okt 1981 - Okt.1982	Anfertigung der Dissertation über "Steroide und Triterpene in Zellkulturen,Untersuchungen mit Zellkulturen von Solanum laciniatum Ait., Solanum wrightii Bth. und Costus speciosus (Koen) Sm." unter Anleitung von Herrn Prof.Dr. E.Reinhard und Herrn Prof.Dr.W.Voelter

Meine akademischen Lehrer waren :

D. M. Hussein, N. S. Joenoes, I.I. Panigoro, E. Reinhard, H. Shahab, S. Sjamsiah, H. Soeharsono, M. Soeharsono , Soemadi, Sumarjadi, W. Voelter.